



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

**ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μηχανισμοί φαρμακοανταπόκρισης και σχετικοί βιοδείκτες στον
καρκίνο**

Ειρήνη Καλογεράκου

A.M. 1813033

Λάρισα, Ιούνιος 2018



UNIVERSITY OF THESSALY

SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

AND BIOTECHNOLOGY

NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION

INSTITUTE OF BIOLOGY, MEDICINAL CHEMISTRY

AND BIOTECHNOLOGY

LABORATORY OF SIGNAL MEDIATED GENE EXPRESSION

BACHELOR THESIS

Drug response mechanisms and related biomarkers in cancer

Eirini Kalogerakou

A.M. 1813033

Larissa, June 2018

Επιβλέποντες Καθηγητές:

Καθηγητής Βιοχημείας Λεωνίδας Δημήτριος, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δρ. Πίντζας Αλέξανδρος, Ερευνητής Α', Διευθυντής Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Καθηγητής Βιοχημείας Λεωνίδας Δημήτριος, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δρ. Πίντζας Αλέξανδρος, Ερευνητής Α', Διευθυντής Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας Ψαρρά Άννα-Μαρία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γονιδιακής Ρύθμισης του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, στο πλαίσιο του προγράμματος σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Συνεπιβλέποντες στην παρούσα εργασία είναι ο Καθηγητής Βιοχημείας Λεωνίδας Δημήτριος στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και ο Δρ. Πίντζας Αλέξανδρος, Ερευνητής Α', Διευθυντής Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Πίντζα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριό του, καθώς και για τη συνεχή καθοδήγηση που μου προσέφερε κατά την εκπόνησή της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Καθηγητή Λεωνίδα για την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου, τη βοήθεια και τη σταθερή υποστήριξη του.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ειδική Τεχνική Επιστήμονα κ. Κοσμίδου Βιβή για τη συνεχή καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, και τον κ. Γ. Ζωγράφο, Διευθυντή της Γ' χειρουργικής κλινικής στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Γ. Γεννηματάς, για τη συνεργασία.

Τέλος, ευχαριστώ τα προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου Ραυτοπούλου Σοφία, Αναγιωτό Κυριάκο και Βλάσση Μαργαρίτα για τη συνεισφορά τους στη μελέτη με προϋπάρχουσα γνώση.

Περίληψη

Στην παρούσα μελέτη σκοπός ήταν η διερεύνηση έκφρασης της προ-αποπτωτικής NOXA και της αντι-αποπτωτικής MCL1 σε 146 κλινικά δείγματα ΚΠΕ και στα αντίστοιχα φυσιολογικά τους, καθώς και να αξιολογηθεί η σημαντικότητα και να διερευνηθεί η συσχέτιση των εκφράσεων των γονιδίων με παρουσία/απουσία μετάλλαξης στο γονίδιο KRAS στον ΚΠΕ με τη χρήση του Medcalc Software (Ostend, Belgium).

Η KRAS είναι GTPάση που συμμετέχει στο μονοπάτι KRAS/RAF/MEK/ERK και βρίσκεται μεταλλαγμένη στο 24-50% των όγκων στο παχύ έντερο, ενώ οι NOXA και MCL1 συμμετέχουν στο ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης. Η NOXA προσδένεται επιλεκτικά στην MCL1 και δεν της επιτρέπει να αναστείλει την απόπτωση.

Χρησιμοποιήθηκαν 146 δείγματα ιστού από ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και 146 δείγματα φυσιολογικού ιστού του παχέος εντέρου. Τα δείγματα προσφέρθηκαν από τη Γ' Χειρουργική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών 'Γεώργιος Γεννηματάς' μετά από έγκριση του πρωτοκόλλου από την Επιστημονική Επιτροπή του Νοσοκομείου. Από τα δείγματα απομονώθηκε RNA, το οποίο με PCR αντίστροφης μεταγραφής μετατράπηκε σε cDNA, και η έκφραση των γονιδίων NOXA και MCL1 διερευνήθηκε με Real Time PCR.

Μέσω των δοκιμασιών Mann Whitney βρέθηκε ότι η NOXA είναι υπερεκφρασμένη στα καρκινικά δείγματα, και όταν αναλύθηκε η έκφρασή της σε δείγματα που φέρουν μετάλλαξη στο KRAS και σε δείγματα που δεν φέρουν, βρέθηκε ότι υπερεκφράζεται ανεξαρτήτως παρουσίας/απουσίας μετάλλαξης KRAS. Ακόμη, η NOXA υπερεκφράζεται σε κάθε καρκινικό στάδιο. Η έκφραση της MCL1 δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων, παρουσιάζει όμως στα KRAS μεταλλαγμένα δείγματα σημαντική μείωση στα καρκινικά σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα. Ο λόγος NOXA/MCL1 βρέθηκε σημαντικά αυξημένος στα καρκινικά δείγματα.

Με την ανάλυση των καμπυλών ROC καθορίστηκε η διαφοροδιαγνωστική αξία της έκφρασης των γονιδίων NOXA, MCL1, υποδοχέα θανάτου DR5 και κυτταρικών αναστολέων απόπτωσης cIAP1 και cIAP2. Κάθε γονίδιο εκτός από το MCL1 είναι καλός διαφοροδιαγνωστικός δείκτης και ο συνδυασμός των γονιδίων NOXA, MCL1, DR5, cIAP1 και cIAP2 είναι πολύ καλός διαφοροδιαγνωστικός δείκτης.

Abstract

The purpose of this study was to investigate the expression of pro-apoptotic NOXA and anti-apoptotic MCL1 in 146 CRC tumour samples and their respective normal mucosa, as well as to evaluate the significance and to investigate the correlation of gene expressions with presence / absence of mutation in KRAS gene in CRC with the use of Medcalc Software (Ostend, Belgium).

KRAS is a GTPase that participates in the KRAS/RAF/MEK/ERK pathway and is mutated in 24-50% of the tumors in colon, while NOXA and MCL1 are involved in the intrinsic pathway of apoptosis. NOXA selectively binds to MCL1 and prevents it from inhibiting apoptosis.

We used 146 tissue samples from colon cancer patients and 146 normal colon samples. The samples were offered by the 3rd Surgical Department of the General Hospital of Athens 'George Gennimatas'. First, RNA was extracted from the samples, which then was converted to cDNA by Reverse Transcription PCR, and finally NOXA and MCL1 gene expression was investigated with Real Time PCR.

Through Mann Whitney tests, NOXA was found to be overexpressed in tumour samples, and when her expression was analysed in mtKRAS and wtKRAS samples, it was found to be overexpressed regardless of the presence / absence of KRAS mutation. Also, NOXA was found overexpressed in every cancer stage. There was a statistically non-significant difference between MCL1 expression in tumour and normal samples, but when the mtKRAS samples were examined a significant decrease of MCL1 expression is observed between the tumour and the normal samples. The NOXA / MCL1 ratio was significantly elevated in tumour samples.

ROC curve analysis determined the differential diagnostic value of the expression of NOXA, MCL1, death receptor DR5 and cellular inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2. Any gene other than MCL1 is differential diagnostic marker and the NOXA, MCL1, DR5, cIAP1 and cIAP2 gene combination is a very good differential diagnostic marker.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract.....	6
1.Εισαγωγή.....	10
1.1 Καρκίνος.....	10
1.1.1 Οι κύριες μορφές καρκίνου.....	10
1.1.2 Χαρακτηριστικά που διαφέρουν μεταξύ των καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων	11
1.1.3 Γονίδια που συμμετέχουν στον καρκίνο.....	11
1.2 Καρκίνος του παχέος εντέρου.....	11
1.2.1 Γενικά και στατιστικά στοιχεία.....	11
1.2.2 Ιστολογία παχέος εντέρου.....	12
1.2.3 Κατηγορίες CRC.....	13
1.2.4 Στάδια εξέλιξης CRC.....	14
1.2.5 Μοριακή και γενετική βάση του καρκίνου του παχέος εντέρου.....	14
1.3 Μονοπάτια	16
1.3.1 Μονοπάτι MAP κινασών.....	16
1.3.2 ΜονοπάτιEGFR-RAS-RAF-MEK-ERK.....	16
1.3.2.A. Ενεργοποίηση EGFR.....	17
1.3.2. B. Ενεργοποίηση RAS.....	17
1.3.2.Γ. Ενεργοποίηση RAF.....	17
1.3.2.Δ. Ενεργοποίηση MEKκαι ERK.....	17
1.3.3.Μονοπάτι RAS-RAF-MEK-ERKστον ΚΠΕ.....	18
1.3.3.A. EGFR.....	18
1.3.3.B. RAS.....	18

1.3.3.Γ.KRAS.....	19
1.3.3.Δ.RAF.....	20
1.3.4.Φαρμακοανταπόκριση στον ΚΠΕ.....	20
1.4.Απόπτωση.....	20
1.4.1.Γενικά στοιχεία για την απόπτωση.....	20
1.4.2.Εξωγενές μονοπάτι	21
1.4.3.Ενδογενές μονοπάτι	22
1.4.4.Αλληλεπίδραση μεταξύ εξωγενούς και ενδογενούς μονοπατιού απόπτωσης..	23
1.4.5.Απόπτωση στον καρκίνο	24
1.4.6.Αναστολή απόπτωσης- IAPS.....	25
1.4.7.MCL1.....	26
1.4.8.MCL1 ως θεραπευτικός στόχος.....	26
1.4.9.NOXA.....	27
1.5.Βιοδείκτες	28
1.5.1.Βιοδείκτες στο μονοπάτι RAS-RAF-MEK-ERK.....	29
1.5.2.Αποπτωτικοί βιοδείκτες	29
2.Υλικά και μέθοδοι.....	31
2.1 Υλικά	31
2.1.1.Αντιδραστήρια	31
2.1.2.Εκκινητές.....	31
2.2 Μέθοδοι.....	32
2.2.1.Μέθοδοι μελέτης RNA.....	32
2.2.2.PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR).....	33
2.2.3.Real Time PCR (qPCR).....	33
2.3.Σκοπός της εργασίας.....	36

3. Αποτελέσματα.....	37
3.1 Στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της NOXA στα δείγματα ΚΠΕ.....	38
3.2 Στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της NOXA ανεξαρτήτως παρουσίας/απουσίας μετάλλαξης στο γονίδιο KRAS.....	40
3.3 Στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της NOXA σε κάθε καρκινικό στάδιο.....	41
3.4 Στατιστικά μη σημαντική μείωση έκφρασης γονιδίου MCL1 σε δείγματα ΚΠΕ....	42
3.5 Στατιστικά σημαντική μειωμένη έκφραση γονιδίου MCL1 σε KRAS μεταλλαγμένα δείγματα.....	43
3.6 Στατιστικά μη σημαντική διαφορά έκφρασης MCL1 σε κανένα καρκινικό στάδιο.	45
3.7 Σημαντικά αυξημένος λόγος έκφρασης NOXA/MCL1 σε κλινικά δείγματα ΚΠΕ..	46
3.8 Αξιολόγηση διαφοροδιαγνωστικής αξίας γονιδίων.....	47
3.8.1 ROC ανάλυση.....	47
3.8.2 ROC ανάλυση για NOXA, MCL1 και συνδυασμό τους.....	48
3.8.3 ROC ανάλυση για DR5, για συνδυασμό DR5 με MCL1, για συνδυασμό DR5 με NOXA και για συνδυασμό DR5, NOXA και MCL1	49
3.8.4 ROC ανάλυση για συνδυασμό NOXA και cIAP1, για συνδυασμό NOXA με cIAP2, για συνδυασμό MCL1 με cIAP1, και για συνδυασμό MCL1 με cIAP2.....	50
3.8.5 ROC ανάλυση για συνδυασμό NOXA με MCL1 και cIAP1, για συνδυασμό NOXA με MCL1 και cIAP2, και για συνδυασμό και των 5 γονιδίων.....	51
4.Συμπεράσματα-Συζήτηση.....	52
4.1 NOXA.....	52
4.2 MCL1.....	52
4.3 Συνδυασμός NOXA, MCL1, DR5, cIAP1 και cIAP2 έχει μεγάλη διαφοροδιαγνωστική αξία (AUC=0,834).....	53
5.Βιβλιογραφία.....	55
6. Παράρτημα	62

1 Εισαγωγή

1.1 Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι ένα σύνολο περισσότερων από 100 ασθενειών, οι οποίες αναπτύσσονται με τη πάροδο του χρόνου και περιλαμβάνουν ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό που οδηγεί στο σχηματισμό μιας κυτταρικής μάζας ή όγκου (νεόπλασμα) (National Institute of Health, Understanding Cancer, 2007). Για να χαρακτηριστεί ένα νεόπλασμα ως καρκίνος πρέπει να είναι κακοήθες (Thompson and Thompson, 2007).

Το νεόπλασμα μπορεί να είναι κακοήθες ή καλοήθες, και οι κύριες διαφορές μεταξύ τους είναι ότι ο κακοήθης όγκος μπορεί να εισβάλει στον περιβάλλοντα φυσιολογικό ιστό και να τον καταστρέψει, καθώς και να εξαπλωθεί μέσω του κυκλοφορικού και του λεμφικού συστήματος σε όλο το σώμα προκαλώντας μεταστάσεις. Ενώ ο καλοήθης όγκος δεν είναι ούτε διηθητικός ούτε μεταστατικός (Cooper GM, 2000; NCBI Pubmed Health, How do cancer cells grow and spread?, 2016)

1.1.1 Οι κύριες μορφές καρκίνου (NCBI Pubmed Health Glossary, Cancer (Malignant Neoplasm), Thompson and Thompson, 2007):

- Καρκίνωμα: όγκος που προέρχεται από τον επιθηλιακό ιστό (δέρμα, κύτταρα που επενδύουν το έντερο, τους βρόγχους και τους μαστικούς αγωγούς)
- Σάρκωμα: όγκος που προέρχεται από μεσεγχυματικό ιστό (οστά και μύες), από συνδετικό ή από νευρικό ιστό
- Αιμοποιητική κακοήθης νεοπλασία-Λευχαιμία: όγκος που ξεκινάει σε αιμοποιητικό ιστό, όπως ο μυελός των οστών, και διασπείρεται μέσω του αίματος
- Λεμφοειδής κακοήθης νεοπλασία- Λέμφωμα και πολλαπλό μυέλωμα: όγκος που ξεκινά σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και διασπείρεται μέσω του λεμφικού συστήματος.
- Νεοπλασία του κεντρικού νευρικού συστήματος: όγκος που ξεκινά σε ιστούς του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού.

1.1.2 Χαρακτηριστικά που διαφέρουν μεταξύ των καρκινικών και των φυσιολογικών κυττάρων (Cooper GM,2000) :

- Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων
- Μειωμένες απαιτήσεις των καρκινικών κυττάρων για αυξητικούς παράγοντες, και παραγωγή σε κάποιες περιπτώσεις αυξητικών παραγόντων που προκαλούν κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αγγειογένεση.
- Τα καρκινικά κύτταρα είναι λιγότερο κολλώδη μεταξύ τους και με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία από τα φυσιολογικά, στοιχείο που ευνοεί τη διήθηση και τη μεταστατικότητα αυτών των κυττάρων.
- Έκκριση πρωτεασών από τα καρκινικά κύτταρα, οι οποίες πέπτουν παράγοντες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, επιτρέποντας στα κύτταρα να εισβάλουν σε γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς.
- Διακοπή διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων σε αρχικό στάδιο, η οποία συνάδει με τον συνεχή πολλαπλασιασμό τους.

1.1.3 Γονίδια που συμμετέχουν στον καρκίνο (Lodish, 2000):

Οι κατηγορίες των γονιδίων που είναι πολύ σημαντικά για την καρκινογένεση είναι τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες υπεύθυνες για την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό και οι μεταλλάξεις τους συμβάλλουν στην ανάπτυξη του καρκίνου. Οι μεταλλάξεις που ευθύνονται για την μετατροπή πρωτοογκογονιδίου σε ογκογονίδιο είναι επικρατείς.

Ογκογονίδιο είναι κάθε γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη ικανή να προκαλέσει καρκίνο σε ζώα και να μετασχηματίσει κύτταρα σε καλλιέργεια και τα περισσότερα προέρχονται από μεταλλαγμένα πρωτοογκογονίδια. Τα πρωτοογκογονίδια είναι φυσιολογικά γονίδια που ρυθμίζουν κυτταρικές λειτουργίες και με μετάλλαξή τους μετατρέπονται σε ογκογονίδια. Πρωτοογκογονίδιο μετατρέπεται σε ογκογονίδιο μέσω μετάλλαξης θέσης, μέσω γονιδιακής ενίσχυσης ή μέσω χρωμοσωμικής μετάθεσης, οι δε μεταλλάξεις μετατροπής οδηγούν σε κέρδος λειτουργίας.

Ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στα ογκοκατασταλτικά γονίδια συμβαίνουν μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας, και κάποιες πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από αυτά είναι πρωτεΐνες που προωθούν την απόπτωση και ένζυμα που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA. Οι ογκογόνες μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι υπολειπόμενες.

1.2 Καρκίνος του παχέος εντέρου

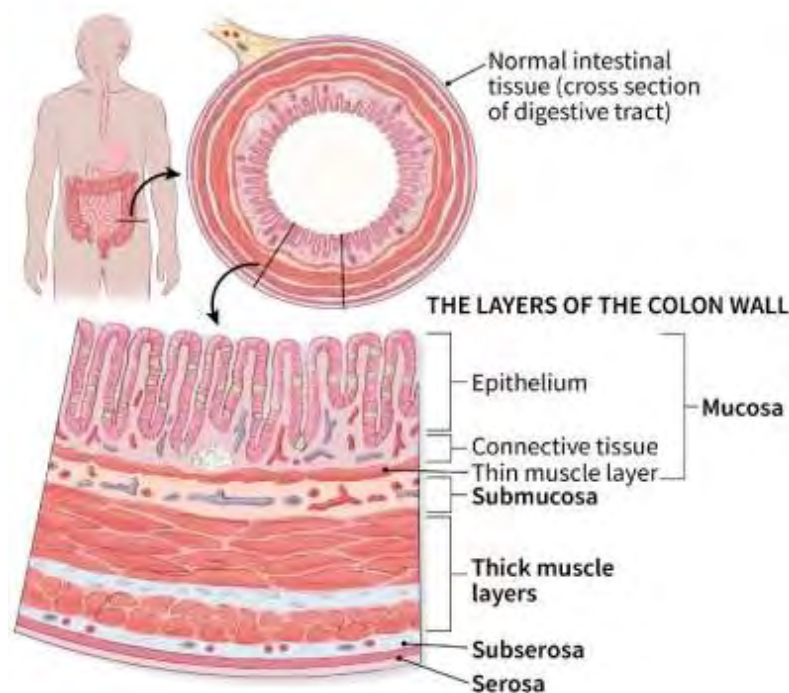
1.2.1 Γενικά και στατιστικά στοιχεία

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου και του ορθού είναι ο τρίτος πιο συχνά διαγνωσμένος καρκίνος σε άνδρες και γυναίκες στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, σύμφωνα με μελέτη του 2017 (Siegel, 2017). Υπολογίζεται η συχνότητα του καρκίνου του παχέος εντέρου μαζί με τη συχνότητα του καρκίνου του ορθού, γιατί σε πολλές περιπτώσεις καταγράφεται εσφαλμένα ο καρκίνος του ορθού ως καρκίνος του παχέος εντέρου στο πιστοποιητικό θανάτου του ασθενούς (Yin, 2011). Ο καρκίνος του παχέος εντέρου προκύπτει από την βαθμιαία συσσώρευση γενετικών και επιγενετικών μεταλλαγών, οι οποίες οδηγούν στον μετασχηματισμό φυσιολογικού βλεννογόνου του παχέος εντέρου σε αδενοκαρκίνωμα (Yamagishi, 2016). Είναι σύνθετη και ετερογενής ασθένεια που περιλαμβάνει πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια (Kosmidou, 2014).

1.2.2 Ιστολογία παχέος εντέρου

Το παχύ έντερο αποτελεί τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα και το τοίχωμά του αποτελείται από 4 χιτώνες, οι οποίοι είναι (Fedoruk, 2014):

- ο βλεννογόνος που αποτελείται από επιθηλιακά κύτταρα, από τα οποία ξεκινούν τουλάχιστον 90% των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου και του ορθού (Fleming, 2012).
- Ο υποβλεννογόνιος χιτώνας που αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό με αιμοφόρα αγγεία και νευρικές ίνες
- ο μυϊκός χιτώνας που αποτελείται από την εσωτερική και την εξωτερική στιβάδα
- ο ορογόνος χιτώνας



Εικόνα 1: Ιστολογία του παχέος εντέρου (cancer.org)

1.2.3 Κατηγορίες CRC

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (ΚΠΕ) με βάση την προέλευση και τη μορφή έκφρασής του διακρίνεται σε 3 κατηγορίες: α) τον σποραδικό, ο οποίος προκύπτει σε άτομα που δεν έχουν γενετική προδιάθεση ούτε οικογενειακό ιστορικό για καρκίνο του παχέος εντέρου και αποτελεί το 60-80% των περιπτώσεων ΚΠΕ, β) τον οικογενή, για τον οποίο δεν έχει βρεθεί κάποιο υπεύθυνο γονίδιο και υπάρχει η υπόθεση ότι προκαλείται από συνδυασμό περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων και αποτελεί το 20-40% των περιπτώσεων, και γ) τον κληρονομικό με δύο γονίδια, τα οποία ξεχωρίζουν μεταξύ τους από την πρόκληση εμφάνισης αδενωματώδους πολυποδίασης. Το ένα είναι το γονίδιο *APC* που προκαλεί οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση (FAP) και χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση πολλαπλών πολυπόδων, και το άλλο είναι το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για τον κληρονομικό μη πολυποδιακό καρκίνο του παχέος εντέρου (HNPCC) ή σύνδρομο Lynch. Το σύνδρομο Lynch σχετίζεται με μεταλλάξεις σε τουλάχιστον 4 γονίδια: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* και *PMS2*. Η κληρονομική μορφή του καρκίνου του παχέος εντέρου αποτελεί το 5% των περιπτώσεων του καρκίνου του παχέος εντέρου. (Arvelo, 2015; Nallamilli, 2017)

1.2.4 Στάδια εξέλιξης CRC

Υπάρχουν 2 συστήματα σταδιοποίησης του καρκίνου του παχέος εντέρου, το σύστημα ταξινόμησης Duke και το σύστημα TNM. Σύμφωνα με το σύστημα του Duke που προτάθηκε το 1932, στο Α στάδιο ο όγκος περιορίζεται στο εντερικό τοίχωμα, στο Β ο όγκος ξεπερνά το εντερικό τοίχωμα, στο Γ παρατηρείται διήθηση σε λεμφαδένες και στο Δ παρατηρείται μακρινή μετάσταση. Πλέον χρησιμοποιείται το TNM (Tumors/Nodes/Metastasis) σύστημα, το οποίο θεωρείται πιο ακριβές από το σύστημα Dukes. Σύμφωνα με το TNM, στο στάδιο 0 υπάρχει καρκίνωμα *in situ*, δηλαδή το καρκίνωμα δεν έχει επεκταθεί πέραν του βλεννογόνου, στο στάδιο Ι επεκτείνεται στον υποβλεννογόνο χιτώνα, στο ΙΙ περνάει στον υποορογόνο χιτώνα, στο ΙΙΙ γίνεται διήθηση σε λεμφαδένες και στο ΙV γίνεται μετάσταση. Κάθε στάδιο υπόκειται σε επιμέρους σταδιοποίηση (a,b,c), έτσι ώστε να είναι περισσότερο περιγραφικό και ακριβές (Sameer, 2013).

Staging and survival of colorectal cancers.

Duke's staging	TNM staging	Description	Survival (%)
	Stage 0	Carcinoma <i>in situ</i>	
A	Stage I	No nodal involvement, no metastases, tumor invades submucosa (T ₁ , N ₀ , M ₀); tumor invades muscularis propria (T ₂ , N ₀ , M ₀)	90–100
B	Stage II	No nodal involvement, no metastases, tumor invades subserosa (T ₃ , N ₀ , M ₀); tumor invades other organs (T ₄ , N ₀ , M ₀)	75–85
C	Stage III	Regional lymph nodes involved (any T, N ₁ , M ₀)	30–40
D	Stage IV	Distant metastases	<5

Εικόνα 2: Σταδιοποίηση και ποσοστά επιβίωσης του καρκίνου του παχέος εντέρου

(Sameer, 2013)

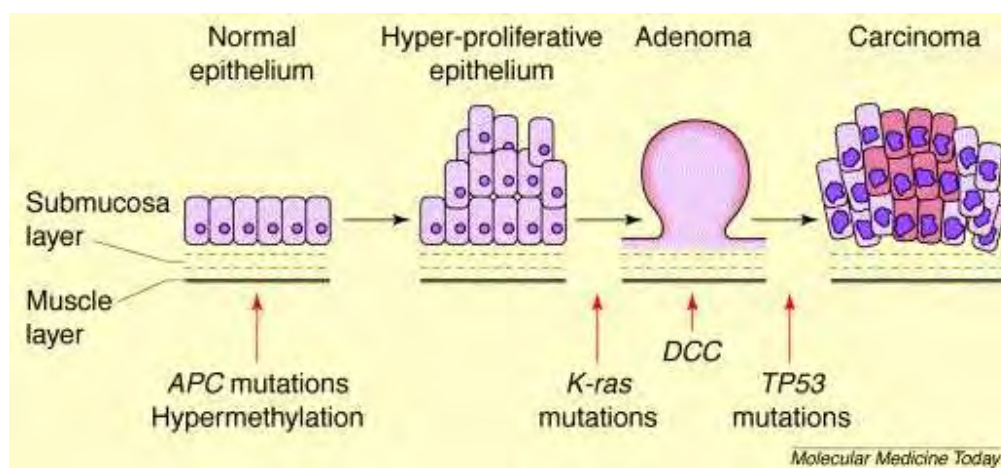
1.2.5 Μοριακή και γενετική βάση του καρκίνου του παχέος εντέρου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι πολυσταδιακή ασθένεια. Εξελίσσεται από φυσιολογικό επιθήλιο στο ενδιάμεσο προκαρκινικό στάδιο, το αδένωμα, και μετά σε καρκίνωμα, το οποίο μπορεί να εισβάλει σε γειτονικούς ιστούς και να προκαλέσει μετάσταση (Carvalho, 2012).

Σύμφωνα με το μοντέλο που προτάθηκε από τους Fearon και Vogelstein το 1990, όγκοι του παχέος εντέρου μπορεί να προκύψουν από μεταλλάξεις που ενεργοποιούν ογκογονίδια σε συνδυασμό με μεταλλάξεις που απενεργοποιούν ογκοκατασταλτικά γονίδια. Επίσης κακοήθεις όγκοι είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων σε τουλάχιστον 4 ή 5 γονίδια και περισσότερο σημαντική για τις βιολογικές ιδιότητες του όγκου είναι η συσσώρευση μεταλλάξεων από τη σειρά με την οποία προκύπτουν (Fearon and Vogelstein, 1990).

Κάποιοι μηχανισμοί με τους οποίους μπορεί να αναπτυχθεί καρκίνος του παχέος εντέρου είναι οι εξής:

- I. Γενωμική αστάθεια, στη μορφή χρωμοσωμικής αστάθειας, βλαβών σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA, μικροδορυφορικής αστάθειας, επιγενετικής σίγασης γονιδίων με ανώμαλη μεθυλίωση του DNA.
- II. Αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως είναι τα γονίδια *APC* και *P53*. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα στην περίπτωση του *APC* τη συνεχή και ακατάλληλη ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt και στην περίπτωση του *p53* αδρανοποιείται το μονοπάτι *P53*. συχνά αυτή η μετάλλαξη συμπίπτει με τη μετατροπή μεγάλων αδενωμάτων σε διηθητικά καρκινώματα.
- III. Ενεργοποίηση ογκογονιδίων, όπως το *KRAS* και το *BRAF*, τα οποία ενεργοποιούν το μονοπάτι των MAP κινάσων και το *PIK3CA* που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της PI3K (Markowitz and Bertagnolli, 2009).



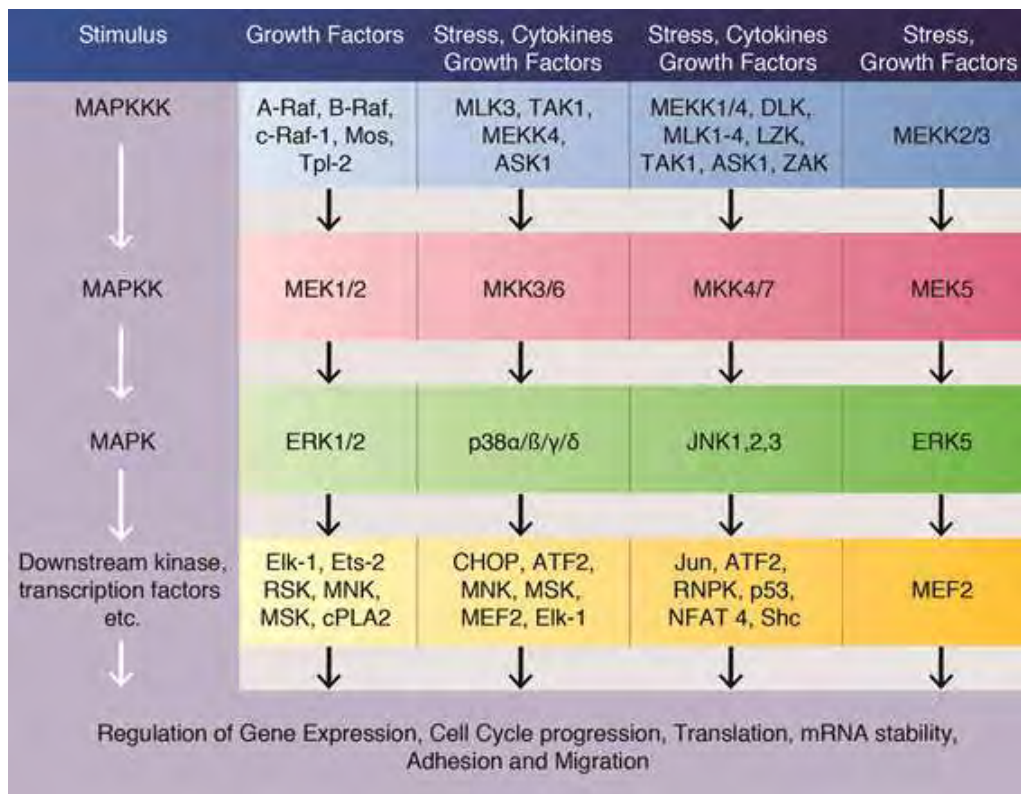
Εικόνα 3: Η ακολουθία αδένωμα προς καρκίνωμα. (Chung-Faye, 2000)

1.3 Μονοπάτια

1.3.1 Μονοπάτι MAP κινασών

Ο καταρράκτης των κινασών ενεργοποιούμενων από μιτογόνα (MAPK) είναι σημαντικός για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, και για την αντίσταση σε θεραπευτικές αγωγές (Burotto,2014). Κάθε μονοπάτι MAPK περιλαμβάνει μία MAPK κινάση κινάση (MAPKKK), μία MAPK κινάση (MAPKK) και μία MAPK. Η MAPKKK ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης και/ή μέσω αλληλεπίδρασης με μικρές G πρωτεΐνες ως απόκριση σε εξωκυτταρικό ερέθισμα, και είναι κινάση ser/thr. Ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης την MAPK κινάση, η οποία είναι πρωτεϊνική κινάση διπλής εξειδίκευσης και η MAPKK ενεργοποιεί την MAPK φωσφορυλιώνοντάς τη σε κατάλοιπα τυροσίνης και θρεονίνης (Cargnello,2011). Η MAPK είναι κινάση ser/thr και φωσφορυλιώνει κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, κινάσες, φωσφατάσες και μεταγραφικούς παράγοντες (Doma, 2013).

Σημαντικά μονοπάτια MAP κινασών είναι το μονοπάτι ERK1/2, ERK5, JNKκαι p38, που ονομάζονται σύμφωνα με την MAPK τους (Slattery, 2012, Cargnello,2011)



Εικόνα 4: Μονοπάτια MAPK στα θηλαστικά (Thermofisher, MAPK cell signaling pathway)

1.3.2 Μονοπάτι EGFR-RAS-RAF-MEK-ERK

A. Ενεργοποίηση EGFR

Το μονοπάτι EGFR-RAS-RAF-MEK-ERK των MAP κινασών παίζει σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του παχέος εντέρου, καθώς μεταλλάξεις σε πρωτεΐνες του συμβάλλουν στην καρκινογένεση αυτού του τύπου. Ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) είναι υποδοχέας κινάσης τυροσίνης (RTK) μεγέθους 170 kDa, και ανήκει στην οικογένεια υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης ErbB (Krasinskas, 2011). Πιθανοί προσδέτες του EGFR είναι ο EGF ή TGF-α (Sasaski, 2013).

B. Ενεργοποίηση RAS

Αρχικά δεσμεύεται ο προσδέτης στον EGFR, με αποτέλεσμα τον διμερισμό του υποδοχέα και την ενεργοποίηση της περιοχής κινάσης τυροσίνης, την οποία ακολουθεί η αυτοφωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης του υποδοχέα. Στη συνέχεια σχηματίζεται σύμπλοκο πρωτεϊνών που αποτελείται από την πρωτεΐνη προσαρμογής GRB2, η οποία προσδένεται στα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης του υποδοχέα μέσω της SH2 περιοχής της, και από τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEF) SOS που προσδένεται στην GRB2 (Krasinskas, 2011). Ο SOS, αφού σχηματίσει το σύμπλοκο, ενεργοποιεί την ανταλλαγή του GDP που είναι δεσμευμένο στη RAS πρωτεΐνη με GTP, με σκοπό τη θετική ρύθμιση της δραστηριότητας της RAS (Cargnello, 2011).

Γ. Ενεργοποίηση RAF

Με την ανταλλαγή GDP με GTP, ενεργοποιείται η μικρή G πρωτεΐνη RAS, η οποία δρα ως μοριακός διακόπτης on/off για το μονοπάτι του EGFR (Karoulia, 2017). Η υποοικογένεια των πρωτεϊνών RAS αποτελείται από τρία μέλη μοριακού μεγέθους 21 kDa, τα HRAS, NRAS, KRAS4A και KRAS4B, τα οποία κωδικοποιούνται από τρία πρωτο-ογκογονίδια· οι υπότυποι KRAS4A και KRAS4B προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα του μεταγράφου του γονιδίου *KRAS* (Prior, 2012; Li, 2016).

Όταν ενεργοποιηθεί η RAS, η RAF (MAPKKK) μεταφέρεται από το κυτοσόλιο στην πλασματική μεμβράνη και σχηματίζει σύμπλοκο με το RAS-GTP. Εκεί η RAF φωσφορυλιώνεται και διμερίζεται έτσι ώστε να ενεργοποιηθεί πλήρως (Karoulia, 2017).

Δ. Ενεργοποίηση MEK και ERK

Οι πρωτεΐνες RAF είναι κινάσες ser/thr και τα μέλη της οικογένειας RAF είναι η c-RAF ή RAF-1, η A-RAF και η B-RAF (Li, 2016). Οι κινάσες RAF φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις κινάσες MEK (MAPKK) (Roberts, 2007). Οι κινάσες MEK 1 (45 kDa) και MEK2 (46 kDa) είναι κινάσες διπλής εξειδίκευσης για τυροσίνη και σερίνη/θρεονίνη, και φωσφορυλιώνουν τις MAPK ERK1 (44 kDa) και ERK2 (42 kDa) σε κατάλοιπα

θρεονίνης και τυροσίνης σε μία συντηρημένη περιοχή Thr-X-Tyr (Cargnello, 2011). Οι ERK1 και ERK2 είναι κινάσες ser/thr και όταν ενεργοποιηθούν μέσω φωσφορύλιωσης μεγάλο μέρος τους μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, ενώ έχουν στόχους κυτταροπλασματικούς και πυρηνικούς. Αυτοί μπορεί να είναι κινάσες, φωσφατάσες, μεταγραφικοί παράγοντες και μπορούν να ρυθμίσουν κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση ή επιβίωση, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο (Wortzel, 2011; Cargnello, 2011; Dhillon, 2007).

1.3.3 Μονοπάτι RAS-RAF-MEK-ERK στον καρκίνο του παχέος εντέρου (ΚΠΕ)

Το μονοπάτι του EGFR ρυθμίζει κυτταρικές λειτουργίες, οι οποίες σε περίπτωση απορρύθμισής του μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη νεοπλασιών. Η απορρύθμιση μπορεί να επιτευχθεί μέσω γονιδιακών μεταλλάξεων (RAS, RAF), γονιδιακής ενίσχυσης και υπερέκφρασης πρωτεϊνών, και μέλη του μονοπατιού EGFR-KRAS-BRAF-MEK-ERK αποτελούν συγκεκριμένους στόχους για θεραπευτική παρέμβαση (Krasinskas, 2011).

A. EGFR

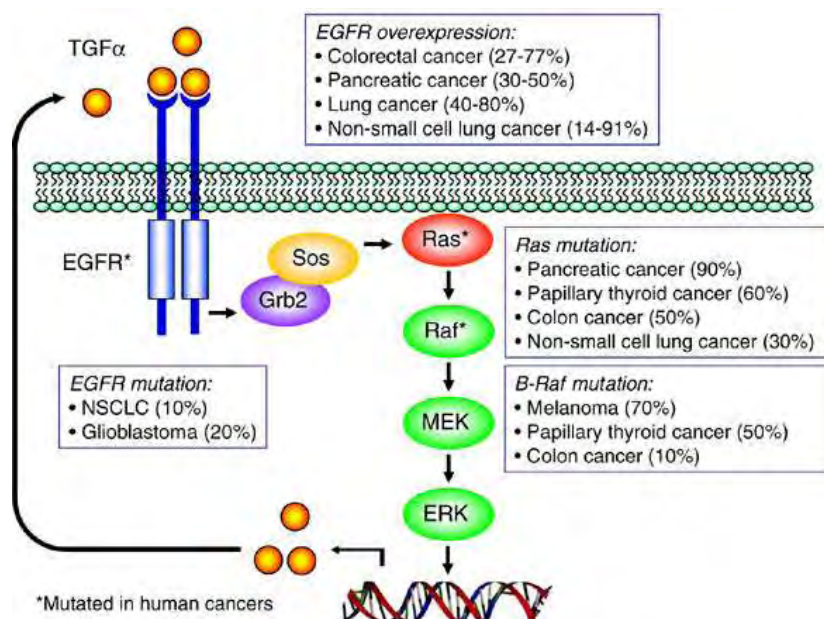
Σε φυσιολογικούς ιστούς υπάρχει στενή ρύθμιση των προσδετών του EGFR, ενώ στον καρκίνο είτε υπάρχει διαρκής παροχή προσδετών του EGFR είτε υπάρχει μετάλλαξη στον EGFR, η οποία 'κλειδώνει' τον υποδοχέα σε κατάσταση συνεχούς ενεργοποίησης (Sasaki, 2013).

Στον καρκίνο του παχέος εντέρου το γονίδιο του EGFR υπερεκφράζεται και η έκφρασή του έχει συνδεθεί με κακή πρόγνωση και μειωμένη επιβίωση σε ασθενείς με μεταστατικό ΚΠΕ. Τα μονοκλωνικά αντισώματα panitumumab και cetuximab χρησιμοποιούνται ως anti-EGFR φάρμακα σε μεταστατικό ΚΠΕ (Qiu, 2018).

B. RAS

Τα RAS είναι τα πρώτα ογκογονίδια που ανακαλύφθηκαν, αλλά και τα συχνότερα μεταλλαγμένα στον καρκίνο, καθώς περίπου το 30% των συνολικών όγκων και το 50% των όγκων του παχέος εντέρου φέρει μετάλλαξη σε γονίδιο RAS. Οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες RAS που προκύπτουν δεν μπορούν να απενεργοποιηθούν από GAP, με αποτέλεσμα να παραμένουν ενεργοποιημένες μέσω του GTP και να προκαλούν συνεχή, ανεξάρτητη από ερέθισμα, ενεργοποίηση του καταρράκτη RAF-MEK-ERK (Hunter, 2015; Roberts, 2007). Στους περισσότερους τύπους καρκίνου που χαρακτηρίζονται από RAS μεταλλάξεις κυριαρχεί η μετάλλαξη μίας ισομορφής RAS, υποδηλώνοντας την ύπαρξη ιστοειδικών ρόλων των ισομορφών στην πρόκληση καρκινογένεσης. Η KRAS είναι μεταλλαγμένη στους στέρεους όγκους (παγκρέατος, πνεύμονα, παχέος εντέρου) πολύ πιο συχνά από την NRAS, ενώ η NRAS είναι μεταλλαγμένη πιο συχνά σε κάποιους αιματολογικούς (λέμφωμα Hodgkin). Η HRAS είναι πιο συχνά μεταλλαγμένη στα

καρκινώματα πλακωδών κυττάρων κεφαλής και τραχήλου (Oikonomou, 2014; Hobbs, 2016).



Εικόνα 5: Ενεργοποίηση του μονοπατιού RAS-RAF-MEK-ERK μέσω ογκογονιδίου (Roberts,2007)

Γ. KRAS

Η πρωτεΐνη Kirsten Rat Sarcoma (KRAS) είναι GTPάση και φέρει μετάλλαξη στο 24-50% των όγκων του παχέος εντέρου, ανάλογα με τη μελέτη και την πηγή των δειγμάτων (Kosmidou, 2014). Σχεδόν όλες οι ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του *KRAS* βρίσκονται στο κωδικόνιο 12 (wild type GGT) και 13 (wild type GGC) του εξωνίου 2, είναι σημειακές και οδηγούν στην αντικατάσταση ενός αμινοξέος. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις του κωδικονίου 12 είναι η μετάπτωση από γουανίνη σε αδενίνη (GGT→ GAT) που είχε ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση γλυκίνης από ασπαραγινικό οξύ (G12D), και η μεταστροφή από γουανίνη σε θυμίνη (GGT→ GTT) που οδήγησε στην αντικατάσταση γλυκίνης από βαλίνη (G12V). Η κύρια μετάλλαξη του κωδικονίου 13 είναι η μετάπτωση από γουανίνη σε αδενίνη (GGC→ GAC) και η αντικατάσταση από γλυκίνη σε ασπαραγινικό οξύ (G13D). Σπάνια βρίσκονται μεταλλάξεις και στο κωδικόνιο 61 του εξωνίου 3 και στο κωδικόνιο 146 του εξωνίου 4 (Dadduzio,2015; Oikonomou, 2014).

Οι μεταλλάξεις στην *KRAS* είναι οδηγοί μεταλλάξεις (driver mutations), καθώς συμβαίνουν σε πολύ αρχικό στάδιο στον μετασχηματισμό φυσιολογικού ιστού σε καρκίνωμα (Oikonomou, 2014). Είναι γενικά αποδεκτό ότι στο στάδιο II και III δεν έχει σημαντική προγνωστική αξία η παρουσία/απουσία μετάλλαξης της *KRAS*, και υπάρχουν αμφιλεγόμενα στοιχεία για την προγνωστική αξία των συγκεκριμένων μεταλλάξεων του γονιδίου *KRAS* (Oikonomou, 2014)

Δ. RAF

Οι RAS αποτελούν πολύ δύσκολο θεραπευτικό στόχο, για αυτό τον λόγο στοχεύονται κυρίως οι RAF, MEK και ERK (Karoulia,2017). Η BRAF βρίσκεται μεταλλαγμένη σε πολλούς καρκίνους, όπως στο παχύ έντερο κατά 10% και στο μελάνωμα, και η κύρια μετάλλαξή της είναι η V600E, ενώ υπάρχει και η V600K. Οι μεταλλάξεις στην BRAF θεωρούνται και αυτές οδηγοί μεταλλάξεις (Οικονομου, 2014). Οι μεταλλάξεις στην KRAS και BRAF θεωρούνται αλληλοαποκλειόμενες, πιθανώς διότι η ύπαρξη και της δεύτερης μετάλλαξης δεν προσφέρει στο κύτταρο κάποιο πλεονέκτημα, αφού και οι δύο μεταλλάξεις ενεργοποιούν τον καταρράκτη ERK-MAPK, υπάρχει η υπόθεση ότι παρέχουν στο κύτταρο πλεονάζοντα ογκογονικά ερεθίσματα (Morkel,2015).

1.3.4 Φαρμακοανταπόκριση στον ΚΠΕ

Η μεταλλαγμένη KRAS προκαλεί συνεχή ενεργοποίηση του μονοπατιού RAF-MEK-ERK, και επειδή η μετάλλαξη συμβαίνει καθοδικά του EGFR, οι anti-EGFR θεραπείες δεν είναι αποτελεσματικές. Πλέον, η εξέταση για την παρουσία/απουσία μετάλλαξης στη KRAS είναι απαραίτητη πριν χορηγηθεί anti-EGFR θεραπεία (Οικονομου,2014; Macedo,2017).

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου χαρακτηρίζεται από ετερογένεια, σε ένα κομμάτι ιστού υπάρχει η πιθανότητα να υπάρχει διαφορετική μετάλλαξη στο γονίδιο *KRAS* στο κέντρο του όγκου και διαφορετική στην περιφέρεια. Έτσι, όγκοι που φαίνονται ιστολογικά παρόμοιοι μπορεί να έχουν διαφορετική πρόγνωση και να μην ανταποκρίνονται στις ίδιες θεραπευτικές αγωγές. Η ετερογένεια μπορεί να περιορίσει τα τεστ μοριακής διάγνωσης και τις στοχευμένες θεραπείες, αφού ένας υποπληθυσμός καρκινικών κυττάρων με διαφορετική μετάλλαξη από αυτή που στοχεύεται ή wt μπορεί να εμφανίσει αντίσταση στη θεραπευτική αγωγή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την υπερανάπτυξη του υποπληθυσμού μετά το τέλος της θεραπείας (Kosmidou,2014).

1.4 Απόπτωση

1.4.1.Γενικά στοιχεία για την απόπτωση

Η απόπτωση, ή διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, γενικότερα χαρακτηρίζεται από διακριτά μορφολογικά χαρακτηριστικά και ενεργειακά εξαρτώμενους βιοχημικούς μηχανισμούς (Elmore,2007). Οι μορφολογικές αλλαγές που συμβαίνουν στο κύτταρο κατά την απόπτωση περιλαμβάνουν συμπύκνωση χρωματίνης και πυρηνικό κατακερματισμό, καθώς και σχηματισμό αποπτωτικών σωματίων (Maríño, 2014). Η απόπτωση συμβαίνει φυσιολογικά κατά την ανάπτυξη και τη γήρανση, όπου δρα ως

ομοιοστατικός μηχανισμός ώστε να διατηρηθεί ο κυτταρικός πληθυσμός, αλλά ενεργοποιείται και ως απόκριση σε κυτταρικό στρες ή τραυματισμό. Ακόμη, υπάρχουν πολλά αποπτωτικά σήματα, δεν οδηγούνται όμως σε απόπτωση όλα τα κύτταρα από το ίδιο ερέθισμα (Ashkenazi 2008; Elmore 2007).

Η απόπτωση παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές ασθένειες, είτε επειδή γίνεται υπερβολική απόπτωση, όπως σε εκφυλιστικά νοσήματα, είτε επειδή γίνεται σε πολύ μικρό βαθμό, όπως στον καρκίνο. Για τον λόγο αυτό τα μονοπάτια της απόπτωσης αποτελούν στόχο αντικαρκινικών φαρμάκων. Ο μηχανισμός της απόπτωσης περιλαμβάνει πολλά μονοπάτια, σε κάθε βήμα των οποίων μπορεί να συμβεί μετάλλαξη, με αποτέλεσμα τον μετασχηματισμό φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά, τη μετάσταση του όγκου και την ανάπτυξη αντίστασης σε αντικαρκινικά φάρμακα (Wong, 2011). Υπάρχουν δύο μονοπάτια που οδηγούν στην απόπτωση, το εξωτερικό (μονοπάτι υποδοχέων θανάτου) που ξεκινά με την πρόσδεση μορίων στους προ-αποπτωτικούς υποδοχείς θανάτου στην κυτταρική μεμβράνη, και το εσωτερικό (μιτοχονδριακό μονοπάτι) που μπορεί να ενεργοποιηθεί ως απόκριση σε ενδοκυτταρικά στρες, ελέγχεται από την οικογένεια πρωτεϊνών BCL-2 και εκτελείται μέσω της διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (MOMP) (Ashkenazi 2008; Kalkavan 2018).

1.4.2.Εξωγενές μονοπάτι

Τα εξωγενή μονοπάτια ξεκινούν μέσω ενεργοποίησης προ-αποπτωτικών διαμεμβρανικών υποδοχέων, των υποδοχέων θανάτου. Οι υποδοχείς θανάτου (death receptors) είναι υποκατηγορία της υπεροικογένειας των TNFR (υποδοχείς του παράγοντα νέκρωσης όγκων). Μέλη της οικογένειας των TNFR μοιράζονται 2-4 παρόμοιες εξωκυτταρικές επικράτειες που είναι πλούσιες σε κυστεΐνες, και μία κυτταροπλασματική επικράτεια περίπου 80 αμινοξέων, που ονομάζεται επικράτεια θανάτου (death domain, DD). Έχουν αναγνωριστεί 6 υποδοχείς θανάτου που μπορούν να επηρεάσουν την απόπτωση άμεσα ή έμμεσα: TNFR1, Fas (CD95), DR3 (Apo3), DR4 (Apo2/TRAILR1), DR5 (TRAILR2) και DR6 (Ashkenazi, 2008; Elmore, 2007; Walczak, 2013). Οι Fas, DR4 και DR5 ρυθμίζουν κυρίως την απόπτωση, σε περιπτώσεις που δεν είναι δυνατή η απόπτωση ενεργοποιούν εναλλακτικά σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το μονοπάτι JNK/c-Jun (Nair, 2014).

Οι προσδέτες των υποδοχέων θανάτου είναι ο TNF-α για τον TNFR1, ο FasL για τον Fas και το TRAIL (Apo2L) για τους DR4 και DR5. Για να προστατευτούν τα κύτταρα από ανεπιθύμητο θάνατο υπάρχουν υποδοχείς-δολώματα (decoy receptors), οι οποίοι έχουν λειτουργική εξωκυτταρική περιοχή σύνδεσης του προσδέτη, αλλά δεν προκαλούν ενεργοποίηση του εξωγενούς μονοπατιού. Υπάρχουν 3 υποδοχείς δολώματα, ο DcR1 και DcR2 που είναι υποδοχείς του TRAIL και ο DcR3 που είναι υποδοχέας του Fas. Ο DcR1 δεν έχει DD, ο DcR2 έχει αναποτελεσματική DD και η υπερέκφραση του DcR3 προκαλεί αναστολή αποπτωτικού θανάτου από Fas (Kumar, 2005). Οι υποδοχείς-δολώματα

προστατεύουν το κύτταρο από ανεπιθύμητη απόπτωση σε κάποιες περιπτώσεις, όμως συνεισφέρουν στη μειωμένη απόπτωση που συμβαίνει κατά την καρκινογένεση.

Η πρόσδεση στους υποδοχείς προκαλεί τον σχηματισμό θέσης δέσμευσης στην DD του υποδοχέα, στην οποία μπορούν να προσδεθούν πρωτεΐνες προσαρμογής που περιέχουν DD. Η πρόσδεση του FasL στον υποδοχέα Fas και του TRAIL στους DR4 και DR5 προκαλεί την πρόσδεση της πρωτεΐνης προσαρμογής FADD (Fas-associated death domain), και η πρόσδεση του TNF-α στον TNFR1 έχει ως αποτέλεσμα την πρόσδεση της TRADD (TNF receptor-associated death domain), της FADD και της RIPK (Receptor-Interacting serine-threonine kinase). Το πρωτεϊνικό σύμπλοκο προσδέτη-υποδοχέα-πρωτεϊνών προσαρμογών (adaptor protein) είναι γνωστό ως το σηματοδοτικό σύμπλοκο πρόκλησης θανάτου (DISC). Το σύμπλοκο DISC ενεργοποιεί τις προ-κασπάσες 8 (FLICE) και 10 ώστε να μετατραπούν σε κασπάσες 8 και 10, και οι κασπάσες στη συνέχεια ενεργοποιούν τις κασπάσες-τελεστές 3,6 και 7, οδηγώντας την κυτταρική αποικοδόμηση στο τελικό στάδιο της απόπτωσης. Η απόπτωση μπορεί να ανασταλεί μέσω της πρωτεΐνης c-FLIP (cellular FLICE inhibitory protein), η οποία προσδένεται στη FADD και στην κασπάση 8 και τις αδρανοποιεί (Wong, 2011; Mukhopadhyay, 2014; Mariño, 2014; Elmore, 2007; Nair, 2014).

Table 1 BCL-2 protein family members and their function

BCL-2 family member	BH domain	Proapoptotic	Antiapoptotic	Proapoptotic function type
BCL-2	BH 1-4		✓	None
BCL-xL	BH 1-4		✓	None
BCL-w	BH 1-4		✓	None
BFL-1	BH 1-4		✓	None
MCL-1	BH 1-4		✓	None
BAX	BH 1-3	✓		Effector
BAK	BH 1-3	✓		Effector
BIM	BH3-only	✓		Activator
BID	BH3-only	✓		Activator
BAD	BH3-only	✓		Sensitizer
BIK	BH3-only	✓		Sensitizer
NOXA	BH3-only	✓		Sensitizer
PUMA	BH3-only	✓		Sensitizer

Εικόνα 6: Πρωτεΐνες οικογένειας BCL-2 και οι λειτουργίες τους (Baig, 2016)

1.4.3. Ενδογενές μονοπάτι

Το ενδογενές μιτοχondριακό μονοπάτι ενεργοποιείται από υποξία, οξειδωτικό στρες και γενετικές βλάβες. Μετά από το ερέθισμα ενεργοποίησης η οικογένεια πρωτεϊνών BCL-2 καθορίζει το μέλλον του κυττάρου. Έχουν ταυτοποιηθεί 25 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της οικογένειας BCL-2 και το πρώτο γονίδιο που ανακαλύφθηκε είναι αυτό που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BCL-2 (B cell lymphoma 2) (Wong, 2011). Οι πρωτεΐνες της οικογένειας BCL-2 χωρίζονται σε προ-αποπτωτικές και αντι-αποπτωτικές, οι αντι-αποπτωτικές διαθέτουν συντηρημένες αμφιπαθείς περιοχές α-έλικας ομόλογες με την BCL-2 (BH 1-4) και είναι οι BCL-2, BCL-XL, BCL-W, BFL-1 ΚΑΙ MCL1. Οι προ-

αποπτωτικές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, υπάρχουν οι αντι-αποπτωτικές BH 1-3 με 3 περιοχές ομόλογες με την BCL-2, στις οποίες ανήκουν οι BAX, BAK και BOK, και οι αντι-αποπτωτικές BH3-only με μία ομόλογη περιοχή στις οποίες ανήκουν οι BIM, BID, BAD, BIK, PUMA και NOXA (Baig, 2016).

Σε φυσιολογικά κύτταρα η BAX βρίσκεται κυρίως στο κυτοσόλιο και η BAK είναι προσδεδεμένη στη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Οι ενεργοποιητές προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες BIM και tBID ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες τελεστές BAK και BAX αντίστοιχα, ώστε αυτές να μεταφερθούν στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, να ολιγομεριστούν και να σχηματίσουν πόρους στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας BCL-2 για να αποτρέψουν την απόπτωση είτε προσδένονται στις ενεργοποιητές πρωτεΐνες για να αναστείλουν τη δράση τους, είτε προσδένονται στις BAX και BAK για να εμποδίσουν τον ολιγομερισμό τους. Οι ευαισθητοποιήτες προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bad, Bik, NOXA και Puma προσδένονται σε αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες και δεν τους επιτρέπουν να δεσμεύσουν προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες, προωθώντας έτσι εμμέσως την απόπτωση. Ακόμη, οι ευαισθητοποιήτες πρωτεΐνες μπορούν να πάρουν τη θέση πρωτεϊνών BAX ή BAK που είναι δεσμευμένες από αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες. Η αλληλεπίδραση μεταξύ προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών επιτυγχάνεται μέσω πρόσδεσης του υδρόφοβου άκρου της BH3 περιοχής των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών στην υδρόφοβη αύλακα που σχηματίζουν οι BH1, BH2 και BH3 περιοχές των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (Montero, 2018).

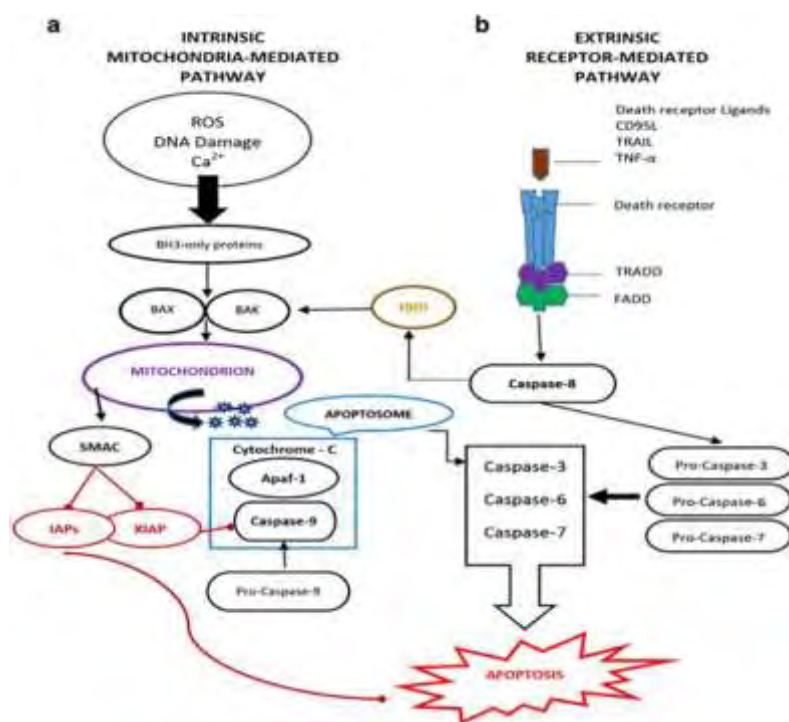
Με την αύξηση της MOMP γίνεται δυνατή η απελευθέρωση προ-αποπτωτικών μορίων από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα, όπως του κυτοχρώματος c, της Smac/DIABLO και του AIF (Apoptosis Inducing Factor). Το κυτόχρωμα c φυσιολογικά βρίσκεται μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, και όταν περάσει στο κυτταρόπλασμα προκαλεί τον σχηματισμό του αποπτοσώματος που αποτελείται από το κυτόχρωμα c, τον Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor-1), dATP και την προκασπάση 9, η οποία μετατρέπεται σε κασπάση 9 και ενεργοποιεί τις κασπάσες τελεστές 3, 6 και 7. Η πρωτεΐνη Smac (Second mitochondria-derived activator of caspase) ή DIABLO (Direct inhibitor of apoptosis-Binding protein with low pI) αφού απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα προσδένεται στις πρωτεΐνες IAPs (Inhibitors of apoptosis) και δεν επιτρέπει την ανασταλτική τους επίδραση στις κασπάσες (Ashkenazi 2008; Martinez-Ruiz, 2008; Weinberg, 2007).

1.4.4. Αλληλεπίδραση μεταξύ εξωγενούς και ενδογενούς μονοπατιού απόπτωσης

Αρχικά, και τα δύο μονοπάτια μπορούν να ενεργοποιηθούν από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, στον πυρήνα η p53 προκαλεί αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων του FasL και του TRAIL και στο κυτταρόπλασμα προκαλεί αύξηση της έκφρασης προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως της PUMA, BAX, BID και NOXA (Mukhopadhyay, 2014).

Ακόμη, η κασπάση 8 που ενεργοποιείται στο εξωγενές μονοπάτι ‘κόβει’ την BH3-only προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bid, η οποία μεταφέρεται στο μιτοχόνδριο. Η tBID (truncated Bid) στο μιτοχόνδριο οδηγεί τη μεταφορά της BAX στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, ώστε να αυξηθεί η MOMP και να συν-ενεργοποιηθεί το ενδογενές μιτοχονδριακό μονοπάτι (Mariño, 2014; Billen 2008).

Τέλος, και τα δύο μονοπάτια καταλήγουν στην κασπάση 3, η οποία ενεργοποιεί τη δεοξυριβονουκλεάση που ενεργοποιείται από κασπάσες (caspase-activated deoxyribonuclease, CAD), ώστε να γίνει η απόπτωση στον πυρήνα. Επίσης οι κασπάσες που ενεργοποιούνται μετά την κασπάση 3 προκαλούν διάσπαση κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών, πρωτεϊνών επιδιόρθωσής του DNA, καθώς και επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο και πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Οι αλλαγές που προκαλούνται από τις κασπάσες συνεισφέρουν συνολικά στις τυπικές μορφολογικές αλλαγές που παρατηρούνται κατά την απόπτωση (Wong, 2011).



Εικόνα 7: a) Το ενδογενές μιτοχονδριακό μονοπάτι και b) το εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης (Baig, 2016)

1.4.5. Απόπτωση στον καρκίνο (Wong, 2011; Hassan, 2014; Abraha, 2016)

Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της καρκινογένεσης έχει η αποφυγή της απόπτωσης. Οι βλάβες που συμβαίνουν στα μονοπάτια της απόπτωσης επιτρέπουν στα νεοπλασματικά κύτταρα να επιβιώνουν πέραν της προβλεπόμενης διάρκειας ζωής τους και παρέχουν προστασία από οξειδωτικό στρες και υποξία όσο επεκτείνεται ο όγκος.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους προκύπτουν μειωμένη απόπτωση ή αντίσταση στην απόπτωση είναι οι εξής:

1. Διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών
 2. Μειωμένη λειτουργία κασπασών
 3. Μειωμένη σηματοδότηση μέσω υποδοχέων θανάτου
-
1. Η ισορροπία διαταράσσεται μέσω υπερέκφρασης αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως η BCL-2 στον καρκίνο του παχέος εντέρου, μέσω μειωμένης έκφρασης προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως η BAX, ή μέσω συνδυασμού τους.
 2. Οι κασπάσες που συμμετέχουν στα μονοπάτια της απόπτωσης χωρίζονται σε 2 κατηγορίες, είναι οι εναρκτήριες 2, 8, 9, και 10 που είναι υπεύθυνες για την έναρξη της απόπτωσης, και οι τελεστές 3, 6 και 7 που προκαλούν τη διάσπαση κυτταρικών συστατικών κατά την απόπτωση. Η απόπτωση μπορεί να ανασταλεί σε πολλούς τύπους καρκίνου μέσω υπερέκφρασης της πρωτεΐνης-FLIP που μπλοκάρει την κασπάση 8.
 3. Οι προσδέτες TRAIL και FasL μπορούν να προσδεθούν σε υποδοχείς- δολώματα, οι οποίοι δεν περιέχουν επικράτεια θανάτου, άρα δεν ενεργοποιείται το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης. Ακόμη και να ενεργοποιηθεί το εξωγενές μονοπάτι, μπορεί να παρατηρηθεί μειωμένη ρύθμιση ή λειτουργία των υποδοχέων, με αποτέλεσμα να είναι εξασθενημένη η σηματοδότηση και να μειώνεται η απόπτωση.

1.4.6.Αναστολή απόπτωσης- IAPS

Οι πρωτεΐνες IAPs (Inhibitors of Apoptosis) είναι ενδογενείς κυτταρικοί αναστολείς εναρκτήριων και τελεστών κασπασών. Οι IAPs χαρακτηρίζονται από την παρουσία επικράτειας BIR (Baculovirus IAP Repeat) 70 αμινοξέων, η οποία ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις με τις κασπάσες. Στην οικογένεια των IAPs ανήκουν οι NAIP (BIRC1), cIAP1 (BIRC2), cIAP2 (BIRC3), XIAP (BIRC4), Survivin (BIRC5), BRUCE (BIRC6), livin (BIRC7) και ILP2 (BIRC8). Οι IAPs περιέχουν 1-3 συντηρημένες περιοχές BIR και η αναστολή της δράσης των κασπασών γίνεται με την πρόσδεση των επικρατειών BIR στα ενεργά κέντρα των κασπασών, με την προώθηση της αποικοδόμησης των κασπασών και με την διατήρηση των κασπασών μακριά από τα υποστρώματά τους (Wong,2011; Silke, 2013; Baig,2016).

cIAPs

Οι cIAP1 και cIAP2 περιέχουν 3 επικράτειες BIR, καθώς και περιοχή πρόσδεσης κασπασών CARD και καρβοξυτελική περιοχή RING. Η περιοχή RING έχει δράση E3 λιγάσης ουβικιτίνης, και προκαλεί ουβικιτίνωση στους προσδέτες της. Οι cIAPs αναστέλλουν έμμεσα την απόπτωση, ενεργοποιώντας αντι-αποπτωτικά μονοπάτια που

ρυθμίζονται από τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-Kb ή από τις MAPK (Baig, 2016; Silke, 2014; Conti, 2015).

1.4.7 MCL1

Η MCL1 είναι η δεύτερη αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη της οικογένειας BCL-2 που ανακαλύφθηκε, μετά την BCL-2. Το γονίδιο της MCL1 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1q21 και αποτελείται από 3 εξόνια. Η πρωτεΐνη MCL1 περιέχει 3 BH περιοχές και το διαμεμβρανικό καρβοξυτελικό της άκρο είναι υπεύθυνο για την παραμονή της πρωτεΐνης στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Στην αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης βρίσκονται δύο αλληλουχίες PEST και έχει εκφραστεί η υπόθεση ότι αυτές ευθύνονται για τον μικρό χρόνο ημιζωής της MCL1 (Akbul, 2009). Σε μία πληθώρα καρκίνων το γονίδιο της MCL1 εμφανίζεται ενισχυμένο και πολλά ογκογονικά μονοπάτια οδηγούν σε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου μέσω μεταφραστικών και μετα-μεταφραστικών μηχανισμών (Kotschy, 2016).

Η MCL1 ως αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη προσδένεται σε προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας BCL-2 ώστε να προωθήσει την επιβίωση του κυττάρου. Προσδένεται σε πρωτεΐνες τελεστές, όπως η BAK στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη ώστε να μην σχηματιστούν πόροι στη μεμβράνη και συνεχιστεί το ενδογενές μονοπάτι. Ακόμη προσδένεται σε πρωτεΐνες ενεργοποιείς και ευαισθητοποιείς, όπως η BIM, PUMA, NOXA, για να αναστείλει την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών τελεστών (Akçay, 2016).

Σύμφωνα με τη μελέτη των Hockings et al η πρόσδεση της MCL1 στην BAK είναι πιο αποτελεσματική και η αποδέσμευση των τελεστών γίνεται δυσκολότερα σε σύγκριση με την πρόσδεση της MCL1 σε BH3-only προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι η ενεργοποιημένη BAK έχει υψηλή συγγένεια για την MCL1 (Thomas, 2010; Hockings, 2018). Η αποδέσμευση της MCL1 από την BAX και BAK πραγματοποιείται μέσω της BIK, tBID και NOXA, οι οποίες επιλεκτικά στοχεύουν το ετεροδιμερές MCL1/BAK και αντικαθιστούν τη BAK ώστε να ενεργοποιηθεί το ενδογενές μονοπάτι απόπτωσης (Akbul, 2009).

1.4.8 MCL1 ως θεραπευτικός στόχος

Αν και η MCL1 είναι αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη, η απορρύθμιση των μονοπατιών που ρυθμίζουν την έκφρασή της μπορεί να προκαλέσει υπερέκφραση του γονιδίου, με αποτέλεσμα να συμβάλλει στην καρκινογένεση. Η αναστολή της MCL1 συχνά επαρκεί για να προωθηθεί η απόπτωση, γι' αυτό αποτελεί πιθανό θεραπευτικό στόχο (Akbul, 2009). Για την αναστολή των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών αναπτύσσονται μόρια-αναστολείς των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, τα BH3 mimetics, τα οποία δεσμεύονται στη θέση πρόσδεσης στις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες και προωθούν την απόπτωση. Ένα BH3 mimetic είναι το S63845, το οποίο επιλεκτικά προσδένεται στην MCL1, ενώ το BH3

mimetic ABT-737 έχει υψηλή συγγένεια για την BCL-2, BCL-XL, BCL-W αλλά δεν μπορεί να προσδεθεί στο MCL1 (Delft,2006; Kotschy, 2016)

1.4.9 NOXA

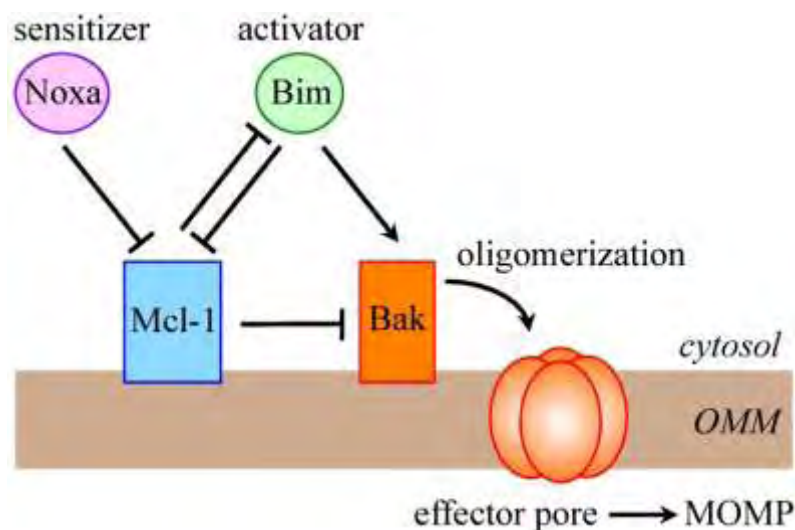
Η NOXA είναι BH3-only προ-αποπτωτική πρωτεΐνη της οικογένειας BCL-2. Η έκφρασή της αυξάνεται μέσω του p53 αλλά και μέσω μονοπατιών ανεξάρτητων από το p53, ως απόκριση σε γενετικές βλάβες ή υποξία (Albert,2014). Το γονίδιο της στον άνθρωπο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 18q21 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη με μία BH3 περιοχή για να αλληλεπιδρά με τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες MCL1 και A1. Ακόμη η NOXA περιέχει κατάλοιπα λυσίνης για να είναι δυνατή η ουβικιτίνωσή της, και το καρβοξυτελικό της άκρο είναι υπεύθυνο για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο (Jansson, 2003; Nakajima,2014).

Η έκφραση και η λειτουργία της Noxa ρυθμίζεται μέσω μεταγραφικών, αλλά και μετα-μεταφραστικών μηχανισμών. Σε φυσιολογικά κύτταρα και στον καρκίνο η λειτουργία και η σταθερότητα της NOXA ρυθμίζεται μέσω μετα-μεταφραστικών μηχανισμών, όπως φωσφορυλίωση ή απομόνωση. Οι πρωτεΐνες διατηρούνται ανενεργές μέσω αυτών των μηχανισμών, μέχρι να χρειαστεί η λειτουργία τους. Στη λευχαιμία η NOXA φωσφορυλιώνεται, με αποτέλεσμα να κατασταλεί η αποπτωτική ιδιότητά της και να προωθήσει την αυτοφαγία. Όταν αποφωσφορυλιωθεί επανακτά την αποπτωτική λειτουργία της (Lowman,2010). Στον καρκίνο του μαστού το γονίδιο της NOXA υπόκειται σε επιγενετική σίγηση μέσω ακετυλίωσης ιστονών (Torres-Adorno,2017). Και στο μελάνωμα το γονίδιο της NOXA υπερεκφράζεται μέσω μεταγραφικού παράγοντα που ενεργοποιείται μέσω της σηματοδότησης MEK/ERK, και προκαλεί κυρίως αυτοφαγία (Liu,2014).

Η NOXA έχει ενδογενή προ-αποπτωτική ικανότητα και ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες BAX και BAK, ώστε να ενεργοποιηθεί το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης, ακόμη και απουσία των BIM, BID και PUMA (Chen,2015) Ο ρόλος της θεωρείται ότι είναι να ευαισθητοποιήσει το κύτταρο στη δράση προ-αποπτωτικών ενεργοποιών και τελεστών πρωτεϊνών με το να τις απομακρύνουν από τα σύμπλοκα με τις αντι-αποπτωτικές. Ακόμη, προσδένεται επιλεκτικά στην MCL1 ώστε να προωθήσει την απόπτωση (Diallo,2007;Albert,2014).

Η NOXA εντοπίζεται κυρίως στο μιτοχόνδριο και ρυθμίζει τον εντοπισμό και τη σταθερότητα της MCL1 μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών μέσω BH3 περιοχής, μέσω μεταφοράς του συμπλόκου NOXA-MCL1 στο μιτοχόνδριο και μέσω ουβικιτίνωσης των καταλοίπων της NOXA ώστε να φωσφορυλιωθεί/ουβικιτινωθεί η MCL1. Η NOXA προσδένεται μέσω της BH3 επικράτειάς της στην MCL1 και οδηγεί την MCL1 σε πρωτεασωμική αποικοδόμηση μέσω ουβικιτίνωσης (Nakajima,2014).

Η έκφραση της NOXA επίσης καθορίζει την ευαισθησία του κυττάρου στο BH3 mimetic ABT-737. Η MCL1 εμφανίζει αντίσταση στο ABT-737, γι' αυτό η NOXA που αδρανοποιεί την MCL1 ευαισθητοποιεί το κύτταρο στο ABT-737, και σύμφωνα με τη μελέτη των Nakajima et al η μειωμένη έκφραση της NOXA είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή απόπτωσης μέσω του ABT-737 (Nakajima,2014; Delft,2006).



Εικόνα 8: Η MCL1 και BAK βρίσκονται συνεχώς στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, η MCL1 δεσμεύει την BAK και τη διατηρεί σε αδρανή μορφή. Εναλλακτικά, η MCL1 προσδένεται σε ενεργοποιές BH3-only πρωτεΐνες, όπως τη Bim, και τις αποτρέπει από το να ενεργοποιήσουν την BAK. Ευαισθητοποιές BH3-only πρωτεΐνες, όπως η NOXA, μπορούν να αναστείλουν τη δέσμευση του BAK, ανταγωνιζόμενες την MCL1 για την BH3 περιοχή της BAK. Οι ενεργοποιημένες BAK σχηματίζουν πόρους στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη για την απελευθέρωση κυτοχρώματος c και την ενεργοποίηση κασπασών. Παρόμοιοι μηχανισμοί ισχύουν και για τις αλληλεπιδράσεις BAX/MCL1 (Mojca,2014).

1.5 Βιοδείκτες

Οι καρκινικοί δείκτες ή βιοδείκτες χαρακτηρίζονται ως μόρια που υποδηλώνουν την παρουσία καρκίνου ή παρέχουν πληροφορίες για την εξέλιξή του ή την ανταπόκριση σε θεραπεία (Duffy,2017). Οι πληροφορίες που προσφέρουν οι βιοδείκτες χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη εξατομικευμένης θεραπείας (Nalejska,2014). Κάποιες κατηγορίες βιοδεικτών είναι οι διαγνωστικοί βιοδείκτες για τη διάγνωση της ασθένειας, οι προγνωστικοί για την προβλεπόμενη πορεία της ασθένειας και οι προβλεπτικοί για την ανταπόκριση στη θεραπεία (Dumbrava,2018). Είναι δύσκολος ο διαχωρισμός μεταξύ προγνωστικού και προβλεπτικού, γιατί ο ίδιος βιοδείκτης μπορεί να είναι καλός

προγνωστικός και προβλεπτικός δείκτης. Ένας καλός βιοδείκτης χαρακτηρίζεται από ειδικότητα για συγκεκριμένο τύπο καρκίνου και το κατάλληλο επίπεδο ευαισθησίας (Nalejska, 2014).

1.5.1 Βιοδείκτες στο μονοπάτι RAS-RAF-MEK-ERK και στον κληρονομικό ΚΠΕ

Οι οδηγοί μεταλλάξεις συμβαίνουν σε πολύ αρχικό στάδιο στην καρκινογένεση και βρίσκονται σε μεγάλο ποσοστό των καρκινικών κυττάρων. Η μετάλλαξη στο γονίδιο *KRAS* είναι οδηγός μετάλλαξη, και η παρουσία/απουσία μετάλλαξης είναι προγνωστικός δείκτης φαρμακοανταπόκρισης σε anti-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα. Η απουσία μετάλλαξης *KRAS* στο 12^ο και 13^ο κωδικόνιο έχει θετική προγνωστική αξία. Ακόμη όμως και σε ασθενείς με υψηλή έκφραση EGFR όπου δεν υπάρχει μετάλλαξη στο 12^ο και 13^ο κωδικόνιο του *KRAS*, η φαρμακοανταπόκριση είναι χειρότερη αν υπάρχει μετάλλαξη στο 61^ο ή 146^ο κωδικόνιο του *KRAS* ή BRAFV600E μετάλλαξη. Ακόμη υπάρχει η ετερογένεια μέσα στον όγκο, κυτταρικοί υποπληθυσμοί φέρουν διαφορετικές μεταλλάξεις και η αναγνώριση και ανάπτυξη βιοδεικτών αποτελεί πρόκληση (Nalejska,2014; Dumbrava,2018). Στον κληρονομικό ΚΠΕ η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *APC* είναι διαγνωστικός δείκτης εμφάνισης οικογενούς αδενωματοώδους πολυποδίασης (Liang,2017).

1.5.2 Αποπτωτικοί βιοδείκτες

Η απενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης είναι σημαντικό χαρακτηριστικό του καρκίνου, και υπάρχει σημαντικό ενδιαφέρον για ανάπτυξη βιοδεικτών που συμμετέχουν στον κυτταρικό θάνατο. Στο εξωγενές μονοπάτι υποδοχείς θανάτου και προσδέτες τους θεωρούνται πιθανοί βιοδείκτες, όπως ο υποδοχέας Fas με τον FasL, και οι DR4 και DR5 με το TRAIL. Ο προ-αποπτωτικός FasL εμφανίζει κυτταροτοξική δράση απέναντι σε καρκινικά κύτταρα, όμως προκαλεί και ηπατοτοξικότητα. Ο TRAIL στοχεύει καρκινικά κύτταρα και προκαλεί εντός ορίων κυτταροτοξικότητα σε φυσιολογικά κύτταρα, όμως μεγάλος αριθμός καρκίνων αποκτούν αντίσταση στο TRAIL (Devetzi,2016; Abraha, 2016). Ο υποδοχέας DR5 υπερεκφράζεται σε καρκίνο του παχέος εντέρου, για την υπερέκφρασή του μπορεί να ευθύνονται μεταλλάξεις στο μονοπάτι των MAP κινασών, όπως στο *KRAS* και *BRAF* (Οικονομου, 2009). Η πρωτεΐνη c-FLIP που αναστέλλει την κασπάση 8 υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του ΚΠΕ, και η υπερέκφρασή της σχετίζεται με εξέλιξη του καρκίνου και/ή κακή πρόγνωση (Hassan,2014). Ακόμη γίνονται προσπάθειες να χαρακτηριστούν ως βιοδείκτες οι κασπάσες, για παράδειγμα η κασπάση 3, η οποία θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση κυττάρων στον ΚΠΕ (Li,2014).

Βιοδείκτες μπορούν να αποτελέσουν και παράγοντες του ενδογενούς μονοπατιού απόπτωσης. Οι cIAP1 και cIAP2 προωθούν την εξέλιξη του όγκου και συνεισφέρουν στην

αντίσταση σε αντικαρκινικές θεραπείες. Η υπερέκφραση τους συνδέεται με κακή πρόγνωση σε διάφορους τύπους καρκίνου και αποτελούν πιθανούς στόχους για θεραπευτική παρέμβαση (Silke, 2014). Ακόμη, η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη MCL1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης, γιατί η υπερέκφρασή της σχετίζεται με την παθογένεση καρκίνων όπως το πολλαπλό μυέλωμα, η οξεία μυελογενής λευχαιμία, το μελάνωμα και ο ΚΠΕ, καθώς και με κακή πρόγνωση στο μελάνωμα και στον καρκίνο του μαστού. Επίσης, η MCL1 εμφανίζει αντίσταση σε αντικαρκινική θεραπεία με το BH3 mimetic, ABT-737 (Akçay,2016; Liu, 2014; Thomas,2010). Η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη NOXA που δεσμεύει την MCL1 είναι πιθανός βιοδείκτης, συχνά βρίσκεται υπερεκφρασμένη στο μελάνωμα, το οποίο σχετίζεται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη του μελανώματος (Liu,2014). Ακόμη, ο λόγος της έκφρασης NOXA/MCL1 είναι πιθανός προγνωστικός βιοδείκτης, διότι σε επιθετικό καρκίνο του μαστού ο χαμηλός λόγος NOXA/MCL1 συσχετίστηκε με μειωμένη επιβίωση σε σχέση με υψηλό λόγο NOXA/MCL1 (Torres-Adorno,2017).

2.Υλικά και μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1.Αντιδραστήρια

Trizol: Invitrogen, Lifetechnology

RNaseOUT (Recombinant Ribonuclease Inhibitor): Invitrogen

5x First Strand Buffer: Invitrogen

Superscript II Reverse Transcriptase: Invitrogen

iQ SYBR- Green Supermix: Biorad

DNTPS για RT-PCR: Promega

Random primers: Promega

DTT: Invitrogen

2.1.2.Εκκινητές

GAPDH F: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3'

R: 5'-CATGGGTGGAATCATATTGGAA-3'

NOXA F: 5'-TGGAAGTCGAGTGTGTGCTACTCAAC-3'

R: 5'-CAGAAGAGTTTGGATATCAGATTCAGA-3'

MCL1 F: 5'-GGACATCAAAAACGAAGACG-3'

R: 5'-GCAGCTTTCTTGGTTTATGG-3'

2.2 Μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκαν 146 δείγματα καρκινικού ιστού και 146 δείγματα φυσιολογικού ιστού που αφαιρέθηκαν από ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, τα δείγματα προσφέρθηκαν από την Γ' Χειρουργική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Αθήνας Γεώργιος Γεννηματάς μετά από έγκριση του πρωτοκόλλου από την Επιστημονική Επιτροπή της Κλινικής.

2.2.1. Μέθοδοι μελέτης RNA

Απομόνωση RNA από κύτταρα

Τα δείγματα μεταφέρονται από την κατάψυξη σε φιαλίδιο με 2 ml Trizol, ομογενοποιούνται και το μείγμα χωρίζεται σε 2 eppendorfs.

Αφήνονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια προστίθενται 200μl χλωροφόρμιο και αφήνονται πάλι τα eppendorfs σε θερμοκρασία δωματίου για 3-5 λεπτά.

Μετά φυγοκεντρούνται σε 12.000g για 20 λεπτά και το μείγμα χωρίζεται στην άνω διαφανή υδατική φάση που περιέχει το RNA, στην ενδιάμεση φάση και στην κάτω οργανική φάση που περιέχει το DNA και πρωτεΐνες. Απομονώνεται η υδατική φάση και μεταφέρεται σε καινούριο eppendorf, όπου προστίθεται ποσότητα ισοπροπανόλης ίση με την ποσότητα της υδατικής φάσης.

Αφήνονται τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και φυγοκεντρούνται πάλι για 20 λεπτά σε 12.000 g μετά τη φυγοκέντρωση το RNA βρίσκεται σε μορφή ιζήματος, έτσι αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται 1ml αιθανόλης 75%.

Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 4 λεπτά σε 7.500 g, αφαιρείται η αιθανόλη, ξαναπροστίθεται 1ml αιθανόλης και γίνεται φυγοκέντρωση για 4 λεπτά σε 7.500 g.

Μετά τη φυγοκέντρωση αφαιρείται η αιθανόλη και γίνεται μία τελική φυγοκέντρωση για 1 λεπτό σε 7.500 g. Ακολουθεί αφαίρεση του υπερκειμένου και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει.

Αφού στεγνώσει προστίθενται 5-25μl απεσταγμένου νερού ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος.

Στη συνέχεια μετράται η συγκέντρωση του RNA σε φωτόμετρο στα 260nm με βάση τον νόμο Lambert-Beer και είναι $C = A_{260} \times 40 \times \text{βαθμό διάλυσης (100)}$.

2.2.2.PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)

Η απαραίτητη ποσότητα RNA επωάζεται στον Thermal Cycler στους 60°C για 2 λεπτά, και στη συνέχεια αφήνεται στον πάγο για 5 λεπτά. Ο σκοπός της επώασης είναι να αποδιαταχθούν το ριβοσωμικό, μεταφορικό και οι άλλες μορφές του RNA που δεν είναι μονόκλωνες όπως το mRNA. Έτσι, στο τέλος της αντίστροφης μεταγραφής θα υπάρχει cDNA από το ολικό RNA του κυττάρου.

Μετά τον πάγο προστίθενται στο eppendorf με το RNA 2 μl oligo dT, 2 μl dNTPs και αποστειρωμένο νερό, η ποσότητα του οποίου εξαρτάται από τα μl του RNA.

Το μείγμα επωάζεται στους 65°C για 5 λεπτά και μετά αφήνεται στον πάγο για 8 λεπτά. Με αυτή την επώαση αποδιατάσσονται οι εκκινητές που δημιουργούν δίκλωνες δομές μεταξύ τους.

Στη συνέχεια προστίθενται 8 μl First Strand Buffer 5x, 4 μl DTT και 1,5 μl RNase OUT και το μείγμα επωάζεται στους 42°C για 2 λεπτά, έτσι ώστε να προσκολληθούν οι εκκινητές στο RNA πριν τον πολυμερισμό.

Μετά προστίθεται 1,5 μl RT, το μείγμα επωάζεται στους 42°C για 60 λεπτά, ώστε να γίνει ο πολυμερισμός του cDNA, και η αντίδραση απενεργοποιείται με θέρμανση στους 70°C για 15 λεπτά.

Τέλος, τα cDNA αραιώνονται με 80 μl αποστειρωμένο νερό.

2.2.3.RealTimePCR (qPCR)

Η Real Time PCR είναι ποσοτική PCR, στην οποία ποσοτικοποιούνται συγκεκριμένες αλληλουχίες στόχοι, αλλά η μέτρηση της ποσότητας προϊόντος πραγματοποιείται σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης μέσω της παρακολούθησης της αύξησης φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Αρχικά υπάρχει η φάση θορύβου (baseline), στην οποία παρατηρείται μη ειδικό φθορίζον σήμα, το οποίο δεν ανιχνεύεται γιατί είναι κατώτερο από ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να είναι ανιχνεύσιμη είναι η τιμή Ct (threshold cycle) και είναι αντιστρόφως ανάλογη με την αρχική ποσότητα του υποστρώματος.

Ακολουθεί η εκθετική ή λογαριθμική φάση, κατά την οποία πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός του προϊόντος, άρα αυξάνεται και το ανιχνευόμενο σήμα. Μετά την ολοκλήρωση της εκθετικής φάσης ακολουθεί η φάση κορεσμού, κατά την οποία αρχίζει να αποδιατάσσεται το DNA και να μειώνεται το φθορίζον σήμα ως αποτέλεσμα. Η φάση κορεσμού φαίνεται με την καμπύλη αποδιάταξης (melting curve).

Η φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι η SYBR green , η οποία προσδένεται σε μικρή αύλακα οποιουδήποτε δίκλωνου DNA και προσδεδεμένη παράγει πολύ πιο έντονο σήμα απ' ότι μη προσδεδεμένη. Άρα όσο αυξάνεται το προϊόν αυξάνεται και το φθορίζον σήμα.

Η χρωστική SYBR green παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι δεν χρειάζεται σχεδιασμό και βελτιστοποίηση, όμως μπορεί να προσδεθεί σε οποιοδήποτε δίκλωνο DNA, άρα μπορεί να προκαλέσει φθορισμό και για μη ειδικό προϊόν. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε σχετικός ποσοτικός προσδιορισμός, δηλαδή χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς το GAPDH, ως προς το οποίο προσδιορίζεται η ποσότητα του γονιδίου-στόχου, οπότε και τυχόν σφάλματα που μπορεί να γίνουν κατά τη διάρκεια του προσδιορισμού να γίνουν και στα δύο γονίδια.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε πλακίδιο 96 θέσεων για PCR και σε κάθε θέση περιέχονται 10μl συνολικά, 2μl cDNA, 0,2μl forward εκκινητές, 0,2μl reverse εκκινητές, 2,6 μl αποστειρωμένο H₂O και 5μl SYBR green supermix.

Το πλακίδιο τοποθετείται στον Bio-Rad iCycler και η αντίδραση πραγματοποιείται σε 45 κύκλους. Αρχικά γίνεται θέρμανση στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα και μετά στους 94°C για 3 λεπτά. Ακολουθούν 40 κύκλοι όπου ο καθένας αποτελείται από 2 στάδια: θέρμανση στους 95°C για 25 δευτερόλεπτα, έτσι ώστε να αποδιαταχθεί πλήρως το δίκλωνο DNA και μετάβαση στους 60°C ώστε να προσδεθούν οι εκκινητές στο αποδιατεταγμένο DNA και να πολυμεριστεί η νεοσυντιθέμενη αλυσίδα. Αφού ολοκληρωθούν οι 40 κύκλοι, πραγματοποιούνται 80 κύκλοι διάρκειας 10 δευτερολέπτων ο καθένας σε θερμοκρασία 55°C, για να γίνει τήξη του DNA και να σχηματιστεί η καμπύλη αποδιάταξης.

1)

TNM στάδιο	Αριθμός ασθενών (146)
I	26
II	48
III	38
IV	28
Μη διαθέσιμο	2
Αδένωμα	4
KRAS status	Αριθμός ασθενών (127)
mutant	68
G13D	34
G12*	20
Διπλή μετάλλαξη	14
wt	59

2)

Τοποθεσία	Αριθμός ασθενών (146)
Κατión κόλον	8
Ανιόν κόλον	22
Εγκάρσιο κόλον	13
Σιγμοειδές κόλον	27
Ορθό/σιγμοειδές	16
Ορθό	55
Ανιόν και εγκάρσιο	1
Ανιόν και σιγμοειδές	1
Αδένωμα	1
Μη διαθέσιμη	2

3)

Διαφοροποίηση	Αριθμός ασθενών (146)
Υψηλή	5
Μέτρια	99
Μέτρια/υψηλή	1
Μέτρια/ χαμηλή	10
χαμηλή	13
Μη διαθέσιμη	6
Αδένωμα	12
Εύρος ηλικίας	41-95

4)

Διήθηση σε λεμφαδένες	Αριθμός ασθενών (146)
θετική	68
αρνητική	72
αδένωμα	4
Μη διαθέσιμη	2

Πίνακες1,2,3,4: Χαρακτηριστικά των δειγμάτων

2.3.Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση έκφρασης σε επίπεδο RNA των γονιδίων *NOXA* και *MCL1* σε 146 δείγματα ΚΠΕ και στα αντίστοιχα φυσιολογικά τους, καθώς και να αξιολογηθεί η σημαντικότητα και να διερευνηθεί η συσχέτιση των εκφράσεων των γονιδίων με παρουσία/απουσία μετάλλαξης στο γονίδιο *KRAS* στον ΚΠΕ.

3. Αποτελέσματα

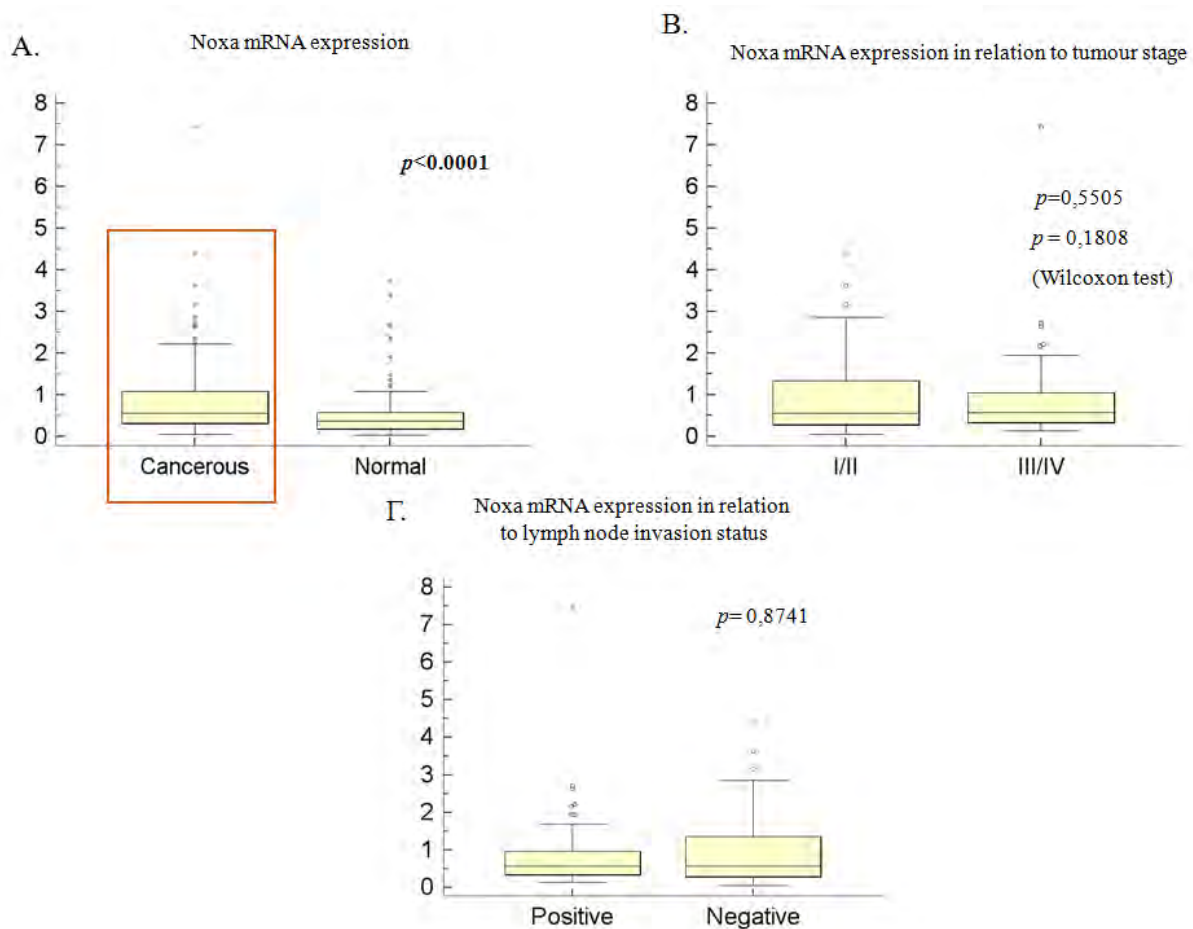
Τα επίπεδα έκφρασης των mRNA των γονιδίων *NOXA* και *MCL1* για τα 108 από τα 146 κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη αποτελούν προϋπάρχουσα γνώση (ευγενική παραχώρηση) από τα μέλη του εργαστηρίου Γονιδιακής Ρύθμισης στο IBΦXB/Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών Κοσμίδου Βιβή, Ραυτοπούλου Σοφία, Αναγιωτό Κυριάκο και Βλάσση Μαργαρίτα. Ακόμη, και η παρουσία ή απουσία μετάλλαξης στο γονίδιο *KRAS* για όλα τα δείγματα αποτελεί προϋπάρχουσα γνώση (ευγενική παραχώρηση) από τη Βλάσση Μαργαρίτα.

Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στόχων ποσοτικοποιήθηκαν με βάση το γονίδιο αναφοράς *GAPDH*. Από τα 146 δείγματα που εξετάστηκαν ως προς την έκφραση των γονιδίων *NOXA* και *MCL1*, γνωρίζουμε την παρουσία/απουσία μετάλλαξης για τα 127, από τα οποία τα 68 φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *KRAS* (G13D, G12* ή διπλή) και τα 59 είναι wt.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αναλύθηκαν με το πρόγραμμα MedCalc Software (Ostend, Belgium), και οι διαφορές αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας δοκιμασία Wilcoxon και Mann Whitney. Με τις δοκιμασίες Mann Whitney και Wilcoxon εξετάζουμε αν η διαφορά στην έκφραση μεταξύ δύο κατηγοριών είναι στατιστικά σημαντική. Χρησιμοποιήθηκε και η ανάλυση ROC για να την αξιολόγηση της δυνατότητας κάθε γονιδίου ξεχωριστά, αλλά και σε συνδυασμό μεταξύ τους, να χρησιμοποιηθεί ως διαφοροδιαγνωστικός βιοδείκτης. Στις δοκιμασίες Wilcoxon και Mann Whitney, τιμές με $p\text{-value} < 0,05$ θεωρούνται στατιστικά σημαντικές και στη ROC, αν το εμβαδό κάτω από την καμπύλη (AUC) είναι μεγαλύτερο από 0,6, το γονίδιο θεωρείται καλός διαφοροδιαγνωστικός βιοδείκτης.

3.1 Στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της NOXA στα δείγματα ΚΠΕ

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της NOXA έγινε σε 146 δείγματα καρκινικού ιστού ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου και στα φυσιολογικά τους.



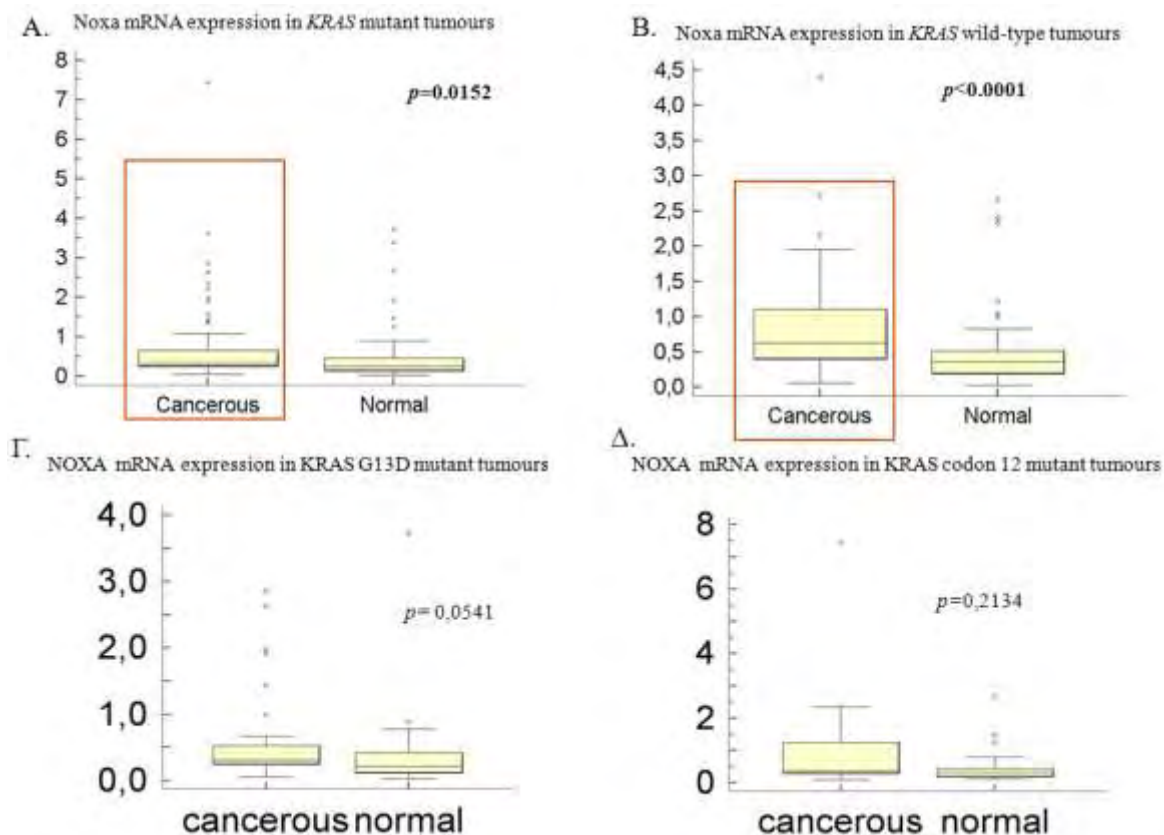
Σχήμα 1: Γράφημα του Mann Whitney test (A) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων (B) μεταξύ καρκινικών δειγμάτων ανάλογα με το στάδιο του όγκου (I/II και III/IV) και (Γ) μεταξύ καρκινικών δειγμάτων ανάλογα με το αν υπήρξε διήθηση στους λεμφαδένες ή όχι.

Μετά από στατιστική ανάλυση των δειγμάτων με Mann Whitney παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$) αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της NOXA στα δείγματα με καρκίνο του παχέος εντέρου σε σχέση με τα φυσιολογικά (Σχήμα 1A). Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης έγινε με Real Time PCR με τη μέθοδο 2- $\Delta\Delta C_q$ (όπου $\Delta\Delta C_q$

= ΔCq (Cq NOXA – Cq GAPDH) παθολογικά – ΔCq (Cq NOXA – Cq GAPDH) φυσιολογικά). Το GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως ενδογενές γονίδιο αναφοράς.

Μετά το στατιστικό τεστ Mann Whitney βρέθηκε ότι ήταν στατιστικά μη σημαντική η διαφορά των επιπέδων του γονιδίου NOXA των καρκινικών δειγμάτων σταδίου I/II συγκριτικά με τα καρκινικά δείγματα σταδίου III/IV (Σχήμα 1B). Επίσης, δεν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των επιπέδων mRNA του γονιδίου NOXA στα δείγματα ασθενών που παρουσίασαν διήθηση σε λεμφαδένες σε σχέση με τα δείγματα ασθενών που δεν παρουσίασαν ($p>0,05$) (Σχήμα 1Γ). Άρα, η έκφραση της NOXA στο σύνολο των καρκινικών δειγμάτων βρίσκεται πολύ σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με την έκφραση στα φυσιολογικά, αλλά δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην έκφραση της NOXA μεταξύ των I/II και των III/IV σταδίων, ούτε μεταξύ των δειγμάτων ασθενών που παρουσίασαν διήθηση στους λεμφαδένες.

3.2 Στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της NOXA ανεξαρτήτως παρουσίας/απουσίας μετάλλαξης στο γονίδιο KRAS

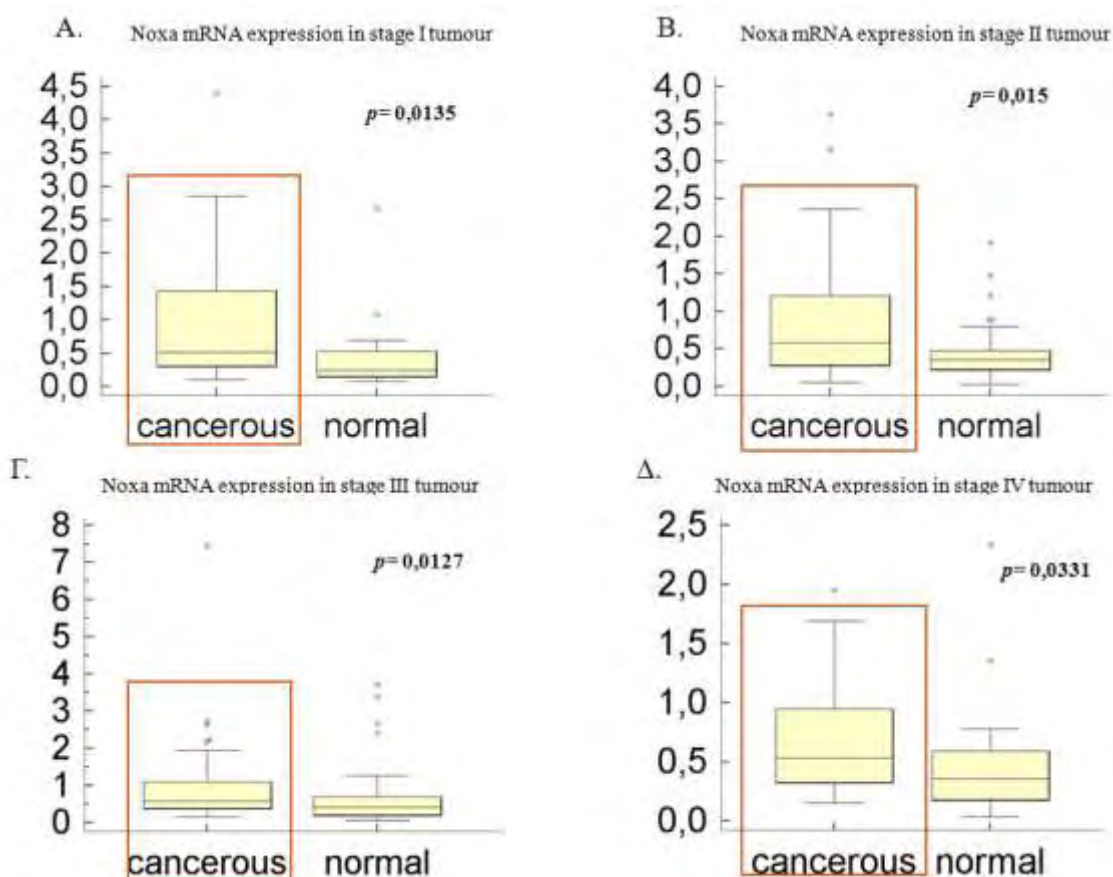


Σχήμα 2: Γράφημα του Mann Whitney test (Α) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων που φέρουν *KRAS* μετάλλαξη, (Β) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων που δεν φέρουν *KRAS* μετάλλαξη, (Γ) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων που φέρουν *KRAS*G13D μετάλλαξη και (Δ) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων που φέρουν μετάλλαξη στο 12^ο κωδικόνιο στο γονίδιο της *KRAS*.

Η στατιστική ανάλυση των δειγμάτων που φέρουν μετάλλαξη *KRAS* με Mann Whitney έδειξε ότι τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου της NOXA παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση στα καρκινικά δείγματα σε σχέση με τα φυσιολογικά (Σχήμα 2Α). Στατιστικά σημαντικά αυξημένα είναι και τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου της NOXA στα καρκινικά δείγματα χωρίς *KRAS* μετάλλαξη σε σχέση με τα φυσιολογικά χωρίς *KRAS* μετάλλαξη (Σχήμα 2Β). Όμως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της NOXA στα καρκινικά και στα φυσιολογικά δείγματα που φέρουν *KRAS*G13D μετάλλαξη (Σχήμα 2Γ) ή μετάλλαξη στο 12^ο κωδικόνιο (Σχήμα 2Δ). Συμπερασματικά, η NOXA υπερεκφράζεται στα καρκινικά δείγματα παρουσία ή απουσία

μετάλλαξης στο *KRAS*, όμως δεν υπερεκφράζεται σε καρκινικά δείγματα με G13D μετάλλαξη ή με μετάλλαξη στο 12^ο κωδικόνιο.

3.3 Στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της NOXA σε κάθε καρκινικό στάδιο



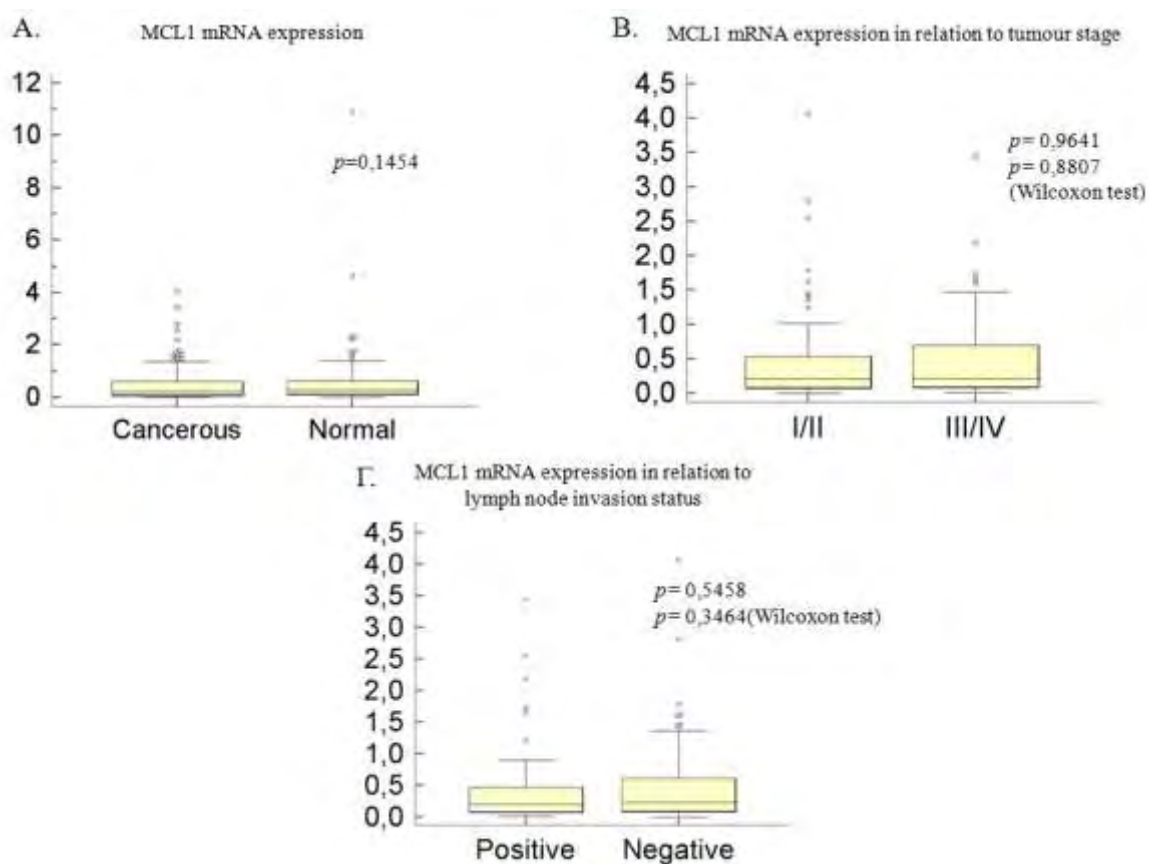
Σχήμα 3: Γράφημα του Mann Whitney test (Α) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων στο στάδιο I, (Β) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων στο στάδιο II, (Γ) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων στο στάδιο III, (Δ) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων στο στάδιο IV.

Στη συνέχεια αναλύσαμε στατιστικά τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου της NOXA σε καρκινικά δείγματα σε σχέση με φυσιολογικά δείγματα ως προς το στάδιο του όγκου. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της NOXA των καρκινικών δειγμάτων είναι αυξημένα σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα στις δοκιμασίες

Mann Whitney που πραγματοποιήθηκαν για κάθε στάδιο (Σχήμα 3Α,Β,Γ,Δ). Άρα η NOXA υπερεκφράζεται σε κάθε καρκινικό στάδιο.

Η ίδια ανάλυση έγινε και ως προς το γονίδιο της MCL1.

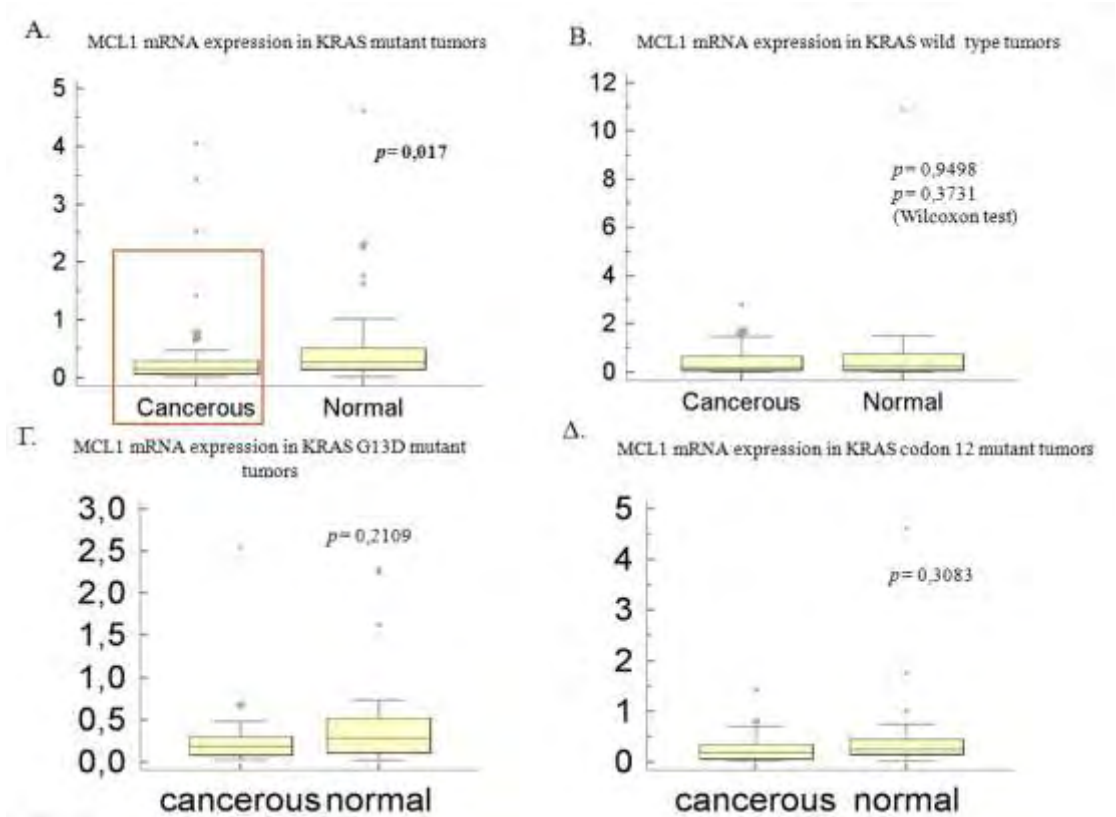
3.4 Στατιστικά μη σημαντική μείωση έκφρασης γονιδίου MCL1 σε δείγματα ΚΠΕ



Σχήμα 4: Γράφημα του Mann Whitney test (Α) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων, (Β) μεταξύ καρκινικών δειγμάτων ανάλογα με το στάδιο του όγκου (I/II και III/IV) και (Γ) μεταξύ καρκινικών δειγμάτων ανάλογα με το αν υπήρξε διήθηση στους λεμφαδένες ή όχι.

Μετά από στατιστική ανάλυση MannWhitney δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων mRNA του γονιδίου MCL1 στα δείγματα με καρκίνο παχέος εντέρου σε σχέση με τα φυσιολογικά ($p>0,05$) (Σχήμα 4Α). Μετά το στατιστικό τεστ Mann Whitney βρέθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των επιπέδων mRNA του γονιδίου NOXA των καρκινικών δειγμάτων σταδίου I/II συγκριτικά με τα καρκινικά δείγματα σταδίου III/IV (Σχήμα 4Β). Επίσης, ήταν στατιστικά μη σημαντική η διαφορά των επιπέδων του γονιδίου NOXA στα δείγματα ασθενών που παρουσίασαν διήθηση σε λεμφαδένες σε σχέση με τα δείγματα ασθενών που δεν παρουσίασαν ($p>0,05$) (Σχήμα 4Γ). Τελικά, η έκφραση της MCL1 δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά στα καρκινικά δείγματα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά, ούτε μεταξύ των δειγμάτων I/II και III/IV σταδίων, ούτε μεταξύ των δειγμάτων ασθενών που παρουσίασαν ή όχι διήθηση στους λεμφαδένες.

3.5 Στατιστικά σημαντική μειωμένη έκφραση γονιδίου MCL1 σε KRAS μεταλλαγμένα δείγματα

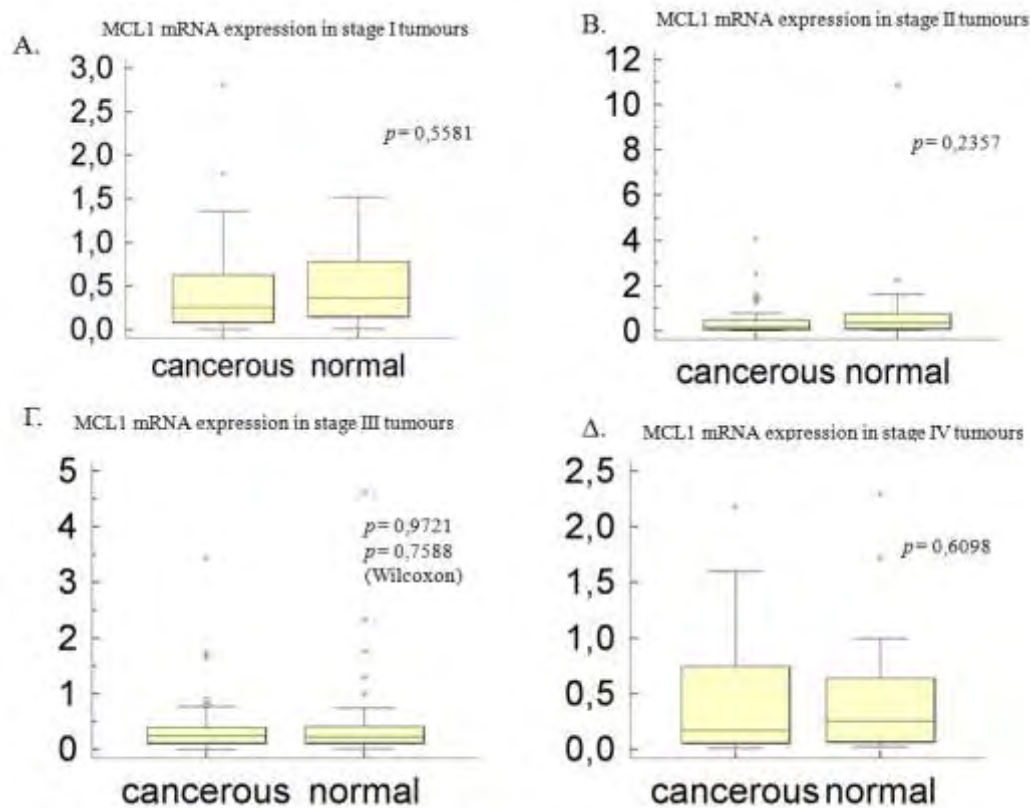


Σχήμα 5: Γράφημα του Mann Whitney test (Α) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων που φέρουν KRAS μετάλλαξη, (Β) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων που δεν φέρουν KRAS μετάλλαξη, (Γ) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων που φέρουν KRASG13D μετάλλαξη και (Δ) μεταξύ καρκινικών και

φυσιολογικών δειγμάτων που φέρουν μετάλλαξη στο 12^ο κωδικόνιο στο γονίδιο της KRAS.

Παρατηρούμε στο γράφημα Mann Whitney (Σχήμα 5Α) ότι το επίπεδο του mRNA του γονιδίου της MCL1 είναι στατιστικά σημαντικά μειωμένο στα καρκινικά δείγματα σε σχέση με τα φυσιολογικά. Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της MCL1 των καρκινικών δειγμάτων που δεν φέρουν KRAS μετάλλαξη και των φυσιολογικών δειγμάτων (Σχήμα 5Β). Παρόλο που υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της MCL1 στα καρκινικά και στα φυσιολογικά δείγματα που έχουν μεταλλαγμένη KRAS, δεν διαφέρουν σημαντικά τα επίπεδα σε δείγματα που φέρουν KRASG13D μεταλλάξεις (Σχήμα 5Γ), ούτε σε δείγματα που είναι μεταλλαγμένο το 12^ο κωδικόνιο του γονιδίου της KRAS (Σχήμα 5Δ). Άρα, η έκφραση της MCL1 σε KRAS μεταλλαγμένα δείγματα βρίσκεται στατιστικά σημαντικά μειωμένη στα καρκινικά σε σχέση με τα φυσιολογικά, ενώ δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ της έκφρασης σε δείγματα χωρίς KRAS μετάλλαξη ή σε δείγματα με G13D ή G12* μετάλλαξη.

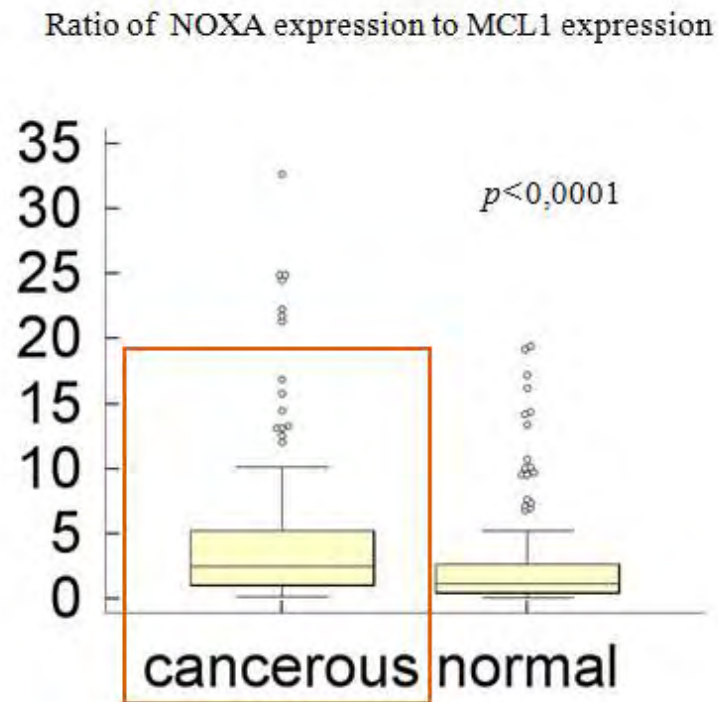
3.6 Στατιστικά μη σημαντική διαφορά έκφρασης MCL1 σε κανένα καρκινικό στάδιο



Σχήμα 6: Γράφημα του Mann Whitney test (Α) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων στο στάδιο I, (Β) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων στο στάδιο II, (Γ) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων στο στάδιο III, (Δ) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων στο στάδιο IV.

Στη συνέχεια αναλύσαμε στατιστικά τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου της MCL1 σε καρκινικά δείγματα σε σχέση με φυσιολογικά δείγματα ως προς το στάδιο του όγκου. Τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου της MCL1 των καρκινικών δειγμάτων δεν διαφέρουν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό από τα επίπεδα των φυσιολογικών δειγμάτων στις δοκιμασίες Mann Whitney που πραγματοποιήθηκαν για κάθε στάδιο (Σχήμα 6 Α,Β,Γ,Δ). Άρα η έκφραση της MCL1 δεν διαφέρει σημαντικά σε κανένα καρκινικό στάδιο.

3.7 Σημαντικά αυξημένος λόγος έκφρασης NOXA/MCL1 σε κλινικά δείγματα ΚΠΕ



Σχήμα 7:Γράφημα του Mann Whitney test μεταξύ του λόγου έκφρασης NOXA/MCL1 μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων.

Από το Mann Whitney test φαίνεται ότι ο λόγος NOXA/MCL1 είναι πολύ αυξημένος σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο στα καρκινικά σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα.

Έκφραση	Ασθενείς	P value
NOXA	146	
Αυξημένη έκφραση στα καρκινικά δείγματα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά	97/146 66,4%	P<0,0001
Μειωμένη έκφραση	26/146 17,8%	
Μη μεταβολή στην έκφραση	23/146 15,7%	
MCL-1	146	
Αυξημένη έκφραση	55/146 37,2%	
Μειωμένη έκφραση	59/146 40,1%	P=0,1454
Μη μεταβολή στην έκφραση	32/146 21,9%	

Πίνακας 5: Ανάλυση έκφρασης των γονιδίων των NOXA και MCL1.

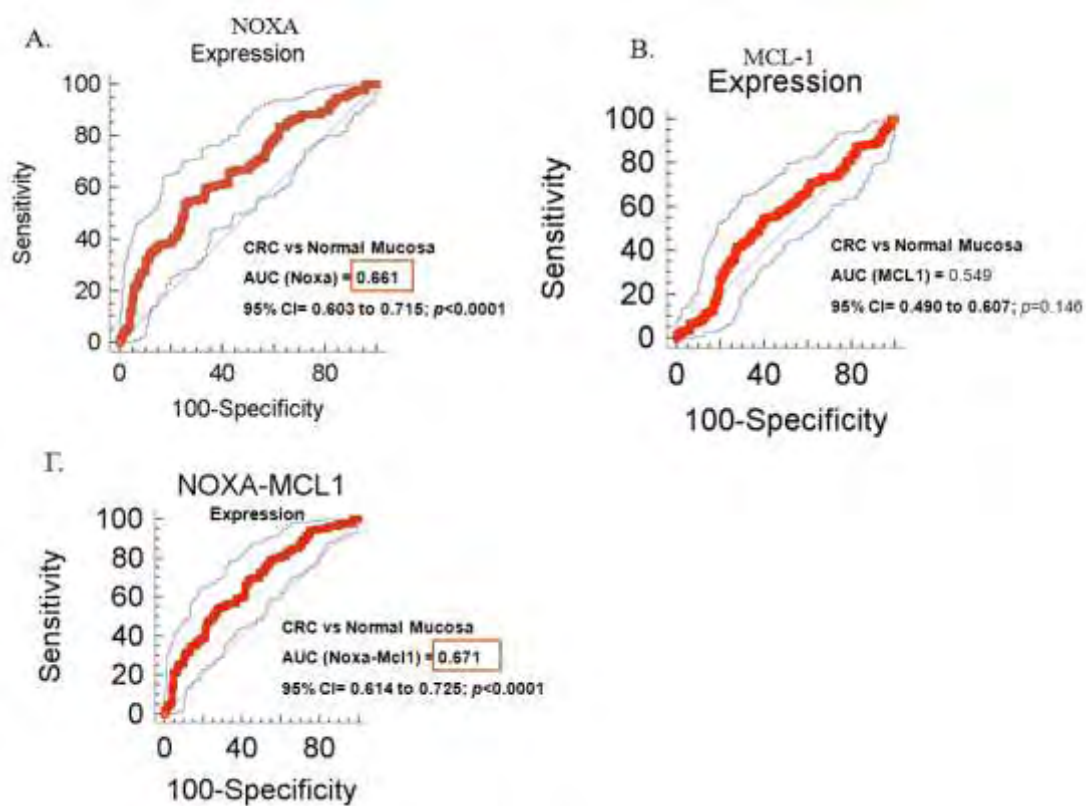
3.8 Αξιολόγηση διαφοροδιαγνωστικής αξίας γονιδίων

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με καμπύλη ROC, ώστε να κριθεί αν συνδυασμοί των γονιδίων της NOXA, της MCL1, της DR5, της cIAP1 και της cIAP2 μπορεί να είναι διαφοροδιαγνωστικός βιοδείκτης. Γνωρίζουμε την διαφοροδιαγνωστική αξία των DR5 cIAP και cIAP2 από το άρθρο των Devetzi et al 2016. Και τα 3 γονίδια είναι διαφοροδιαγνωστικοί βιοδείκτες με $AUC > 0,6$.

3.8.1 ROC ανάλυση

Η επιφάνεια κάτω από τη καμπύλη ROC είναι μετρική της ακρίβειας του μοντέλου. Όσο πιο κοντά στη διαγώνιο τόσο λιγότερο ακριβές είναι. $AUC = 0,5$ καμία διαγνωστική αξία, $AUC = 1$ τέλεια διαγνωστική αξία. Για να υπάρχει διαφοροδιαγνωστική αξία πρέπει $0,6 < AUC < 1$. Το γονίδιο της NOXA μπορεί να θεωρηθεί καλός διαφοροδιαγνωστικός δείκτης γιατί $AUC > 0,6$.

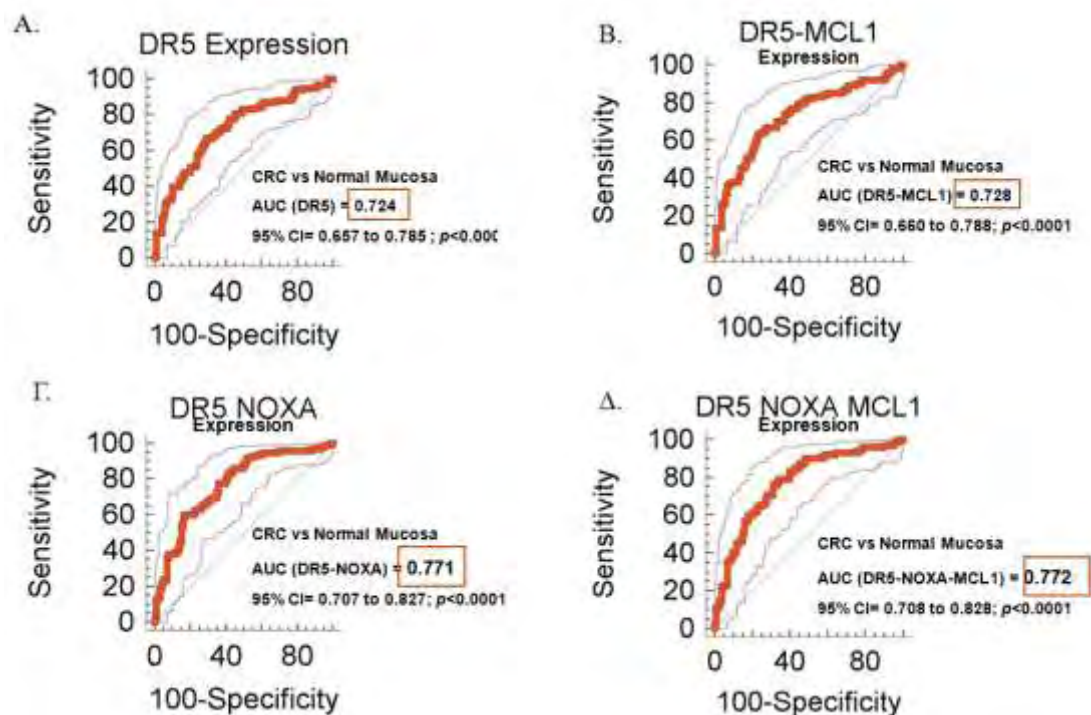
3.8.2 ROC ανάλυση για NOXA, MCL1 και συνδυασμό τους



Σχήμα 8: Καμπύλη ROC για την αξιολόγηση της διαφοροδιαγνωστικής αξίας (Α) της NOXA, (Β) της MCL1 και (Γ) του συνδυασμού των γονιδίων της NOXA και της MCL1.

Η έκφραση της NOXA έχει καλή διαφοροδιαγνωστική αξία με $AUC > 0,6$ (Σχήμα 8Α), αλλά το γονίδιο MCL1 δεν μπορεί να θεωρηθεί διαφοροδιαγνωστικός δείκτης ($AUC < 0,6$) (Σχήμα 8Β). Ο συνδυασμός της έκφρασης των γονιδίων της NOXA και της MCL1 έχει καλή διαφοροδιαγνωστική αξία, αφού $AUC > 0,6$ (Σχήμα 8Γ). Άρα, η NOXA και ο συνδυασμός NOXA και MCL1 αποτελούν καλό διαφοροδιαγνωστικό δείκτη, αλλά η MCL1 δεν είναι καλός διαφοροδιαγνωστικός δείκτης.

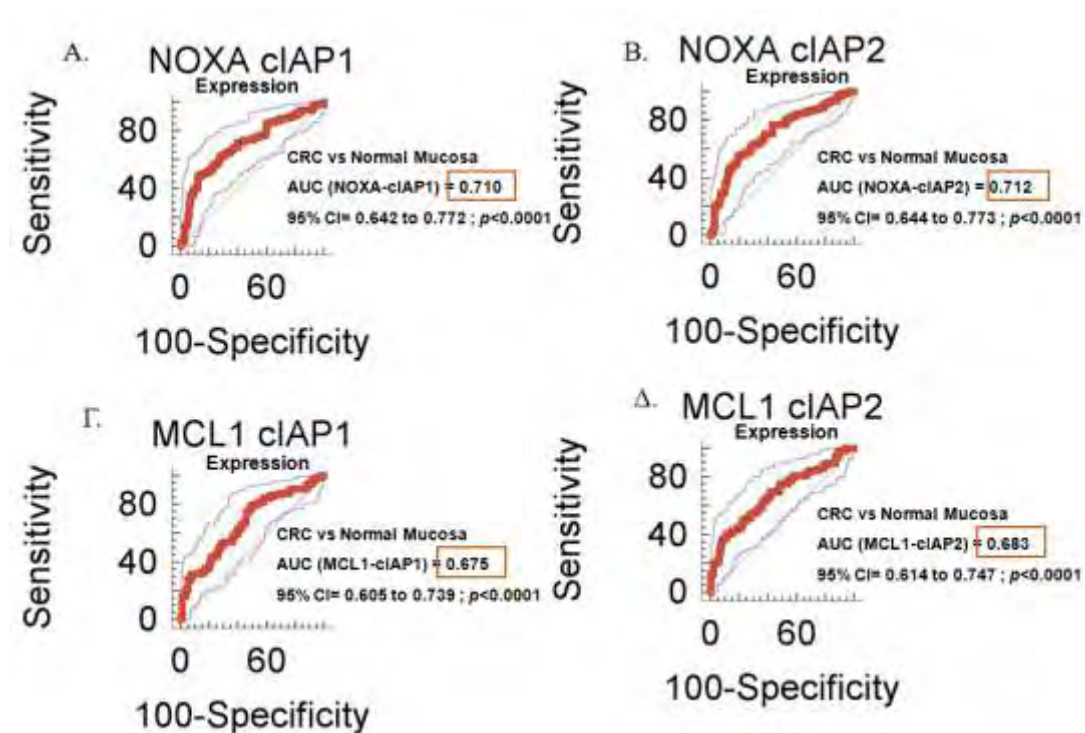
3.8.3 ROC ανάλυση για DR5, για συνδυασμό DR5 με MCL1, για συνδυασμό DR5 με NOXA και για συνδυασμό DR5, NOXA και MCL1



Σχήμα 9: Καμπύλες ROC για τη διαφοροδιαγνωστική αξία (Α) του γονιδίου της DR5, (Β) του γονιδίου της DR5 σε συνδυασμό με το γονίδιο της MCL1, (Γ) του γονιδίου της DR5 σε συνδυασμό με το γονίδιο της NOXA και (Δ) του γονιδίου της DR5 σε συνδυασμό με τα γονίδια της MCL1 και της NOXA.

Από το άρθρο των Devetzi et al 2016 γνωρίζουμε ότι το γονίδιο της DR5 έχει διαφοροδιαγνωστική αξία μόνο του (Σχήμα 9Α), και εξετάσαμε αν ο συνδυασμός του με NOXA, MCL1 και NOXA και MCL1 είναι βιοδείκτης. Η έκφραση του γονιδίου DR5 συνδυαστικά με τη NOXA (Σχήμα 9Β), την MCL1 (Σχήμα 9Γ), και συνδυαστικά και με τα 2 γονίδια (Σχήμα 9Δ), έχει διαφοροδιαγνωστική αξία.

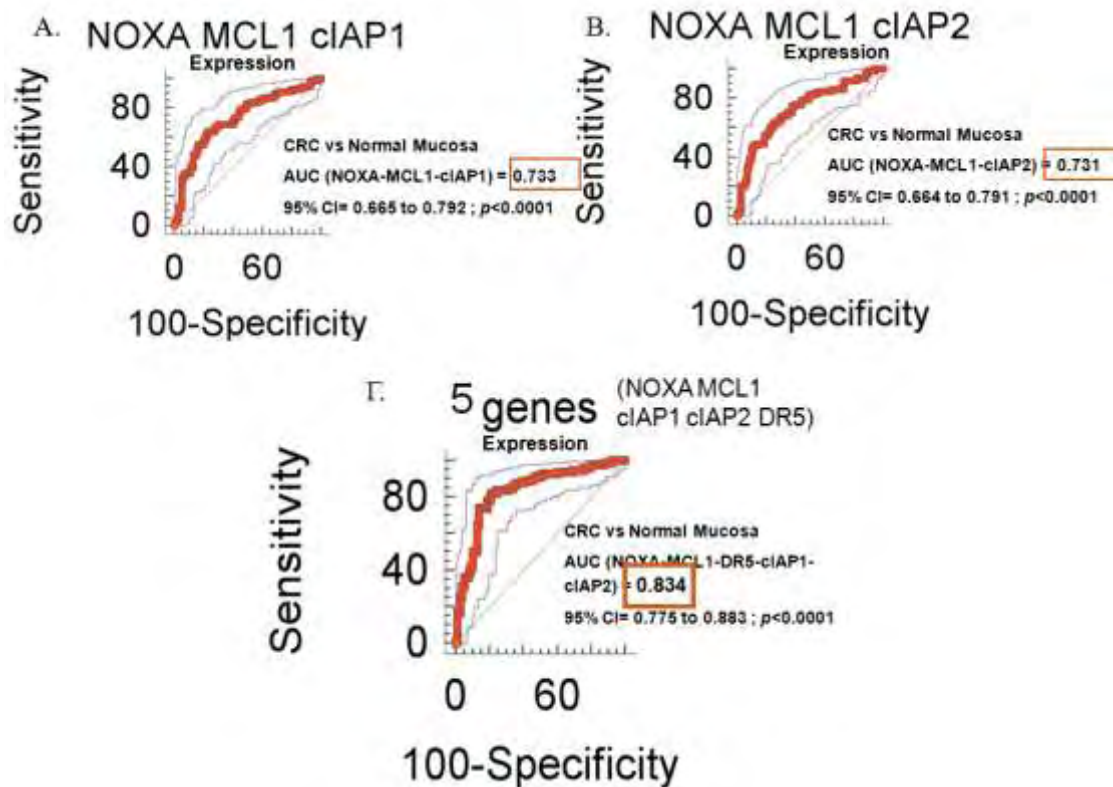
3.8.4 ROC ανάλυση για συνδυασμό NOXA και cIAP1, για συνδυασμό NOXA με cIAP2, για συνδυασμό MCL1 με cIAP1, και για συνδυασμό MCL1 με cIAP2



Σχήμα 10: Καμπύλες ROC για την αξιολόγηση της συνδυαστικής διαφοροδιαγνωστικής αξίας των γονιδίων (Α) των NOXA και cIAP1, (Β) των NOXA και cIAP2, (Γ) των MCL1 και cIAP1 και (Δ) των MCL1 και cIAP2.

Ο συνδυασμός της έκφρασης των γονιδίων NOXA και cIAP1 έχει καλή διαφοροδιαγνωστική αξία (Σχήμα 10Α), όπως και ο συνδυασμός NOXA και cIAP2 (Σχήμα 10Β), MCL1 και cIAP1 (Σχήμα 10Γ) και MCL1 και cIAP2 (Σχήμα 10Δ).

3.8.5 Ο συνδυασμός των 5 γονιδίων έχει πολύ καλή διαφοροδιαγνωστική αξία (AUC=0,834)



Σχήμα 11: Καμπύλες ROC για την συνδυαστική διαφοροδιαγνωστική αξία των γονιδίων των (Α) NOXA, MCL1 και cIAP1, (Β) NOXA, MCL1 και cIAP2 και (Γ) NOXA, MCL1, cIAP1, cIAP2 και DR5.

Διαφοροδιαγνωστική αξία έχουν συνδυαστικά τα γονίδια των NOXA, MCL1, cIAP1 (Σχήμα 11Α), και NOXA, MCL1, cIAP2 (Σχήμα 11Β), και τη μεγαλύτερη διαφοροδιαγνωστική αξία έχουν τα 5 γονίδια συνδυαστικά, τα γονίδια της NOXA, MCL1, cIAP1, cIAP2 και DR5 με AUC=0,834 (Σχήμα 11Γ).

4.Συμπεράσματα-Συζήτηση

Υπάρχει συνεχής αναζήτηση διαγνωστικών και προγνωστικών βιοδεικτών με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για την ανίχνευση και πρόγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Επειδή όμως δεν υπάρχει ο τέλειος δείκτης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί συνδυασμός ευαίσθητων και ειδικών δεικτών ώστε ο συνδυασμός τους να έχει την καλύτερη διαφοροδιαγνωστική αξία (Devetzi,2016).

4.1 NOXA

Στα κλινικά δείγματα ΚΠΕ η έκφραση της NOXA βρέθηκε αυξημένη σε πολύ μεγάλο βαθμό στο σύνολο των καρκινικών δειγμάτων έναντι των φυσιολογικών, ενώ στατιστικά σημαντική αύξηση παρουσιάζει και σε κάθε καρκινικό στάδιο. Ακόμη, σε mtKRAS και wtKRAS δείγματα παρατηρείται υπερέκφρασή της Noxa στα καρκινικά δείγματα.

Η Noxa όπως γνωρίζουμε υπερεκφράζεται και στο μελάνωμα. Στο μελάνωμα η αύξηση της έκφρασης της NOXA οφείλεται στην ενεργοποίηση του μονοπατιού RAF/MEK/ERK, με σκοπό τη μεταγραφική ρύθμισή της από μεταγραφικό παράγοντα. Αν και η NOXA είναι προ-αποπτωτική πρωτεΐνη, η υπερέκφρασή της στο μελάνωμα σχετίζεται όχι με την προώθηση της απόπτωσης, αλλά με την προώθηση της αυτοφαγίας. Υπάρχει η υπόθεση ότι με παρόμοιο τρόπο ρυθμίζεται και η έκφραση της NOXA στον ΚΠΕ (Liu, 2014).

Όσον αφορά την αυξημένη έκφραση της Noxa και σε KRAS μεταλλαγμένα και σε KRAS wild type καρκινικά δείγματα, σύμφωνα με μελέτη των Conti et al 2015 η mtKRAS προκαλεί αύξηση της έκφρασης της NOXA σε προκαρκινικά κύτταρα στο παχύ έντερο μέσω των MEK/ERK, αλλά όχι σε καρκινικά. Άρα αφού η παρουσία ή απουσία KRAS δεν επηρεάζει την έκφραση της NOXA, δικαιολογείται η υπερέκφραση της NOXA και στις δύο περιπτώσεις (Conti,2015).

4.2 MCL1

Στη μελέτη μας βρήκαμε την έκφραση της MCL1 στατιστικά μη σημαντικά μειωμένη στα καρκινικά σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα, αλλά η MCL1 παρουσιάζει στατιστικά σημαντικά μειωμένη έκφραση σε KRAS μεταλλαγμένα δείγματα στα καρκινικά έναντι των φυσιολογικών.

Παρόλο που η MCL1 βρίσκεται αυξημένη σε πολλούς καρκίνους, η υπερέκφραση της NOXA, η οποία αδρανοποιεί την MCL1 και προκαλεί την αποικοδόμησή της, μπορεί να εξηγεί την μείωση της MCL1 (Tong,2017). Η NOXA είναι προ-αποπτωτική πρωτεΐνη και δεσμεύει επιλεκτικά την αντι-αποπτωτική MCL1 ώστε να εμποδίσει την αντι-αποπτωτική δράση της και να προωθήσει την απόπτωση. Η NOXA σχηματίζει σύμπλοκο με την MCL1 και την οδηγεί στην αποικοδόμηση.

Από την ανάλυση του λόγου των εκφράσεων NOXA/MCL1 παρατηρήσαμε ότι είναι στατιστικά σημαντικά μειωμένος στα καρκινικά σε σύγκριση με τα φυσιολογικά δείγματα. Γνωρίζουμε ότι ο χαμηλός λόγος NOXA/MCL1 συσχετίζεται με μειωμένη επιβίωση σε σχέση με υψηλό λόγο NOXA/MCL1 σε επιθετικό καρκίνο του μαστού, άρα μπορεί ο λόγος NOXA/MCL1 να είναι δείκτης αυξημένης επιβίωσης και στον ΚΠΕ (Torres-Adorno, 2017). Χρειάζεται περεταίρω έρευνα για την αξιολόγηση του λόγου ως βιοδείκτη.

4.3 Συνδυασμός *NOXA*, *MCL1*, *DR5*, *cIAP1* και *cIAP2* έχει μεγάλη διαφοροδιαγνωστική αξία (AUC=0,834)

Μέσω ROC ανάλυσης καθορίστηκε η διαφοροδιαγνωστική αξία των *NOXA*, *MCL1*, του υποδοχέα θανάτου *DR5* και των αναστολέων της απόπτωσης *cIAP1* και *cIAP2*.

Ο *DR5* ως υποδοχέας θανάτου ευαισθητοποιεί το κύτταρο σε θάνατο μέσω του *TRAIL*, και βρίσκεται συχνά υπερεκφρασμένος στον ΚΠΕ. Η υπερέκφρασή του οφείλεται και σε *KRAS* και *BRAF* μεταλλάξεις και αποτελεί δείκτη για καλύτερη πρόγνωση του ΚΠΕ (Οικονομου, 2009). Οι *cIAPs* εμφανίζουν αυξημένη έκφραση στον ΚΠΕ, η οποία συνεισφέρει στην καρκινογένεση στο παχύ έντερο και είναι δείκτης κακής πρόγνωσης σε ασθενείς με ΚΠΕ (Miura, 2011).

Γνωρίζουμε από μελέτη των Devetzi et al ότι οι *cIAP1*, *cIAP2* και *DR5* είναι καλοί διαφοροδιαγνωστικοί βιοδείκτες (Devetzi, 2016).

Η *NOXA* βρέθηκε ότι είναι καλός διαφοροδιαγνωστικός βιοδείκτης, αλλά η *MCL1* δεν είναι. Οι συνδυασμοί της έκφρασης των γονιδίων έχουν διαφοροδιαγνωστική αξία, και ο συνδυασμός των *NOXA*, *MCL1*, *DR5*, *cIAP1* και *cIAP2* γονιδίων έχει πολύ καλή διαφοροδιαγνωστική αξία με το πολλά υποσχόμενο AUC= 0,834. Μετά τον συνδυασμό των 5 γονιδίων, το μεγαλύτερο AUC και άρα διαφοροδιαγνωστική αξία έχει ο συνδυασμός των *DR5*, *NOXA* και *MCL1* (AUC=0,772), αλλά επειδή δεν είναι δείκτης το *MCL1*, θεωρούμε τον συνδυασμό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω έρευνα τον συνδυασμό *NOXA* και *MCL1* (AUC=0,771).

Άλλος πιθανός βιοδείκτης είναι η *BRAF*, γιατί είναι μεταλλαγμένη στο 10% των ΚΠΕ και έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση. Ακόμη, οι μεταλλάξεις στο *KRAS* και *BRAF* είναι αλληλοαποκλειόμενες. Επίσης η *p53* είναι πιθανός βιοδείκτης, και η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη εντοπίζεται στο 60% των ΚΠΕ (Zarkavelis, 2017). Και η καταλυτική υπομονάδα της *PI3K* (*PIK3CA*) μπορεί να είναι δείκτης, η έκφρασή της αυξάνεται και η *PIK3CA* βρίσκεται μεταλλαγμένη στο 10-20% του ΚΠΕ. Οι μεταλλάξεις της *PIK3CA* σχετίζονται με τις μεταλλάξεις της *KRAS*, και όταν η *KRAS* είναι wt, η *PIK3CA* είναι δείκτης μη ανταπόκρισης σε anti-EGFR θεραπείες (Cathomas, 2014).

Υπάρχουν και πολλές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην απόπτωση και είναι πιθανοί βιοδείκτες, όπως η πρωτεΐνη c-FLIP, η οποία αναστέλλει την κασπάση 8, υπερεκφράζεται στον ΚΠΕ, και η υπερέκφρασή της σχετίζεται με εξέλιξη του καρκίνου και/ή κακή πρόγνωση (Hassan, 2014). Ακόμη στον ΚΠΕ υπερεκφράζονται οι προσδέτες Fas και TRAIL, και σχετίζονται με κακή πρόγνωση (Zeestraten, 2013). Ακόμη, η υπερέκφραση της αντι-αποπτωτικής BCL-2 στον ΚΠΕ σχετίζεται με αυξημένη επιβίωση, άρα μπορεί να μην έχει μόνο αντι-αποπτωτικό ρόλο, αλλά και να επηρεάζει αρνητικά τον κυτταρικό κύκλο ώστε να μειώσει την ανάπτυξη του όγκου (Zeestraten, 2013).

Ο συνδυασμός των 5 γονιδίων *NOXA*, *MCL1*, *DR5*, *cIAP1* και *cIAP2* που εξετάσαμε αποτελεί πολύ καλό διαφοροδιαγνωστικό δείκτη, και στο μέλλον θα παρουσίαζε ενδιαφέρον να εξεταστεί η διαφοροδιαγνωστική αξία συνδυασμού των 5 γονιδίων σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, αλλά και να συνδυαστούν οι βιοδείκτες με το μεγαλύτερο AUC μαζί με άλλα πιθανά γονίδια βιοδείκτες, όπως το TRAIL, τον FasL και το c-FLIP.

5 Βιβλιογραφία

1. Abraha AM, Ketema EB. Apoptotic pathways as a therapeutic target for colorectal cancer treatment. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2016;8(8):583-591.
2. Akçay G, Belmonte MA, Aquila B, Chuaqui C, Hird AW, Lamb ML, Rawlins PB, Su N, Tentarelli S, Grimster NP, Su Q. Inhibition of MCL1 through covalent modification of a noncatalytic lysine side chain. *Nat Chem Biol*. 2016 (11):931-936.
3. Akgul C, MCL1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2009 66(8):1326-36.
4. Albert MC, Brinkmann K, Kashkar H. NOXA and cancer therapy: Tuning up the mitochondrial death machinery in response to chemotherapy. *Mol Cell Oncol*. 2014 ;1(1):e29906.
5. American Cancer Society, Colorectal Cancer Stages, <https://www.cancer.org/cancer/colorectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>
6. Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Biology of colorectal cancer. *ecancermedicalsecience*. 2015;9:520.
7. Ashkenazi A, Herbst RS. To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(6):1979-1990.
8. Baig S., I Seevasant, J Mohamad, A Mukheem, H Z Huri & T Kamarul Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand? *Cell Death & Disease* (2016) volume7, e2058
9. Billen LP, Shamas-Din A, Andrews DW. Bid: a BAX-like BH3 protein. *Oncogene*. 2008 Dec;27 Suppl 1:S93-104.
10. Burotto M, Chiou VL, Lee J-M, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. *Cancer*. 2014;120(22):3446-3456..
11. Cargnello M., and Philippe P. Roux. “Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR 75.1 (2011): 50–83.
12. Carvalho, B., Sillars-Hardebol, A. H., Postma, C., Mongera, S., Droste, J. T. S., Obulkasim, A. Meijer, G. A.. Colorectal adenoma to carcinoma progression is accompanied by changes in gene expression associated with ageing, chromosomal instability, and fatty acid metabolism. *Cellular Oncology (Dordrecht)*, (2012) 35(1), 53–63.
13. Cathomas G. PIK3CA in Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2014;4:35.
14. Chen H-C, Kanai M, Inoue-Yamauchi A, et al. An Interconnected Hierarchical Model of Cell Death Regulation by the BCL-2 Family. *Nature cell biology*. 2015;17(10):1270-1281.

15. Chung-Faye, Guy A et al. Gene therapy strategies for colon cancer. *Molecular Medicine Today* , Volume 6 , Issue 2 2000, 82 – 87,
16. Conti, A. et al. “Oncogenic KRAS Sensitizes Premalignant, but Not Malignant Cells, to NOXA-Dependent Apoptosis through the Activation of the MEK/ERK Pathway.” *Oncotarget* 6.13 (2015): 10994–11008.
17. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. The Development and Causes of Cancer. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>
18. Dadduzio V., Michele Basso, Sabrina Rossi, Tonia Cenci, Sara Capodimonti, Antonia Strippoli, Armando Orlandi, Eleonora Cerchiaro, Giovanni Schinzari, Alessandra Cassano, et al. KRAS Exon 2 Mutations as Prognostic Indicators in Advanced Colorectal Cancer in Clinical Practice: A Mono-Institutional Study. *Mol Diagn Ther*. 2016 ; 20(1): 65–74
19. Delft V, Mark F. et al. “The BH3 Mimetic ABT-737 Targets Selective BCL-2 Proteins and Efficiently Induces Apoptosis via BAK/BAX If MCL1 Is Neutralized.” *Cancer cell* 10.5 (2006): 389–399. PMC
20. Devetzi M., Vivian Kosmidou, Margarita Vlassi, Iraklis Perysinakis, Chrysanthi Aggeli, Theodosia Choreftaki, Georgios N. Zografos & Alexander Pintzas Death receptor 5 (DR5) and a 5-gene apoptotic biomarker panel with significant differential diagnostic potential in colorectal cancer *Scientific Reports* volume6, Article number: 36532 (2016)
21. Dhillon A. S., S. Hagan, O. Rath, W. Kolch ,MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007; 26(22): 3279–3290.
22. Diallo JS, Aldejmah A, Mouhim AF, Péant B, Fahmy MA, Koumakpayi IH, Sircar K, Bégin LR, Mes-Masson AM, Saad F. NOXA and PUMA expression add to clinical markers in predicting biochemical recurrence of prostate cancer patients in a survival tree model. *Clin Cancer Res*. 2007;13(23):7044-52.
23. Doma, Eszter, Christian Rupp, and Manuela Baccarini. “EGFR-Ras-Raf Signaling in Epidermal Stem Cells: Roles in Hair Follicle Development, Regeneration, Tissue Remodeling and Epidermal Cancers.” *International Journal of Molecular Sciences* 14.10 (2013): 19361–19384.
24. Duffy M. J. Clinical use of tumor biomarkers: An overview *Klin.Biochem.Metab.*,25 (46), 2017, No. 4, p. 157–161.
25. Dumbrava E.I., Funda Meric-Bernstam & Timothy A. Yap: Challenges with biomarkers in cancer drug discovery and development, *Expert Opinion on Drug Discovery* (2018)
26. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.

27. Fearon Eric R., Bert Vogelstein, A genetic model for colorectal tumorigenesis, *Cell*, Volume 61, Issue 5, 1990, 759-767
28. Fedoruk M.J., S.Hong. Gastrointestinal System. *Encyclopedia of Toxicology* (Third Edition). 2014 702-705.
29. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2012;3(3):153-173.
30. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *BioMed Research International*.;2014:150845.
31. Hobbs GA, Der CJ, Rossman KL. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of Cell Science*. 2016;129(7):1287-1292.
32. Hockings C, Alsop AE, Fennell SC, Lee EF, Fairlie WD, Dewson G, Kluck RM. MCL1 and Bcl-x_L sequestration of BAK confers differential resistance to BH3-only proteins. *Cell Death Differ*. 2018 (4):719-732.
33. Hunter J.C., Anuj Manandhar, Martin A. Carrasco, Deepak Gurbani, Sudershan Gondi, Kenneth D. Westover Biochemical and Structural Analysis of Common Cancer-Associated KRAS Mutations. *Mol Cancer Res*. 2015 (9): 1325–1335.
34. Jansson AK, Emterling AM, Arbman G, Sun XF. NOXA in colorectal cancer: a study on DNA, mRNA and protein expression. *Oncogene*. 2003;22(30):4675-8.
35. Kalkavan H., Douglas R Green. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ*. 2018 (1): 46–55
36. Karoulia Z., Evripidis Gavathiotis, Poulikos I. Poulikakos. New perspectives for targeting RAF kinase in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2017 676–691
37. Kosmidou V., Eftychia Oikonomou, Margarita Vlassi, Spyros Avlonitis, Anastasia Katseli, Iraklis Tsipras, Despina Mourtzoukou, Georgios Kontogeorgos, Georgios Zografos, Alexander Pintzas. Tumor heterogeneity revealed by KRAS, BRAF, and PIK3CA pyrosequencing: KRAS and PIK3CA intratumor mutation profile differences and their therapeutic implications. *Hum Mutat*. 2014; 35(3): 329–340
38. Kotschy A., Zoltán Szlavik, et al, The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models, *Nature* volume 538, (2016); 477–482
39. Krasinskas A.M., “EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma,” *Pathology Research International*, vol. 2011, Article ID 932932, 2011

40. Kumar R., P.E. Herbert, A.N. Warrens, An introduction to death receptors in apoptosis, *International Journal of Surgery*, Volume 3, Issue 4, 2005, Pages 268-277
41. Li L, Zhao G-D, Shi Z, Qi L-L, Zhou L-Y, Fu Z-X. The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC. *Oncology Letters*. 2016;12(5):3045-3050
42. Liang, Tie-Jun et al. "APC Hypermethylation for Early Diagnosis of Colorectal Cancer: A Meta-Analysis and Literature Review." *Oncotarget* 8.28 (2017): 46468–46479. PMC.
43. Liu YL, Lai F, Wilmott JS, et al. NOXA upregulation by oncogenic activation of MEK/ERK through CREB promotes autophagy in human melanoma cells. *Oncotarget*. 2014;5(22):11237-11251.
44. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman;. Section 24.2, Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes. 2000
45. Lowman XH, McDonnell MA, Kosloske A, Odumade OA, Jenness C, Karim CB, Jemmerson R, Kelekar A. The proapoptotic function of NOXA in human leukemia cells is regulated by the kinase Cdk5 and by glucose. *Mol Cell*. 2010;40(5):823-33.
46. Mariño G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 (2):81-94.
47. Markowitz, Sanford D., and Monica M. Bertagnolli. "Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer." *The New England journal of medicine* 361.25 (2009): 2449–2460. PMC.
48. Martinez-Ruiz G, Maldonado V, Ceballos-Cancino G, Grajeda JPR, Melendez-Zajgla J. Role of Smac/DIABLO in cancer progression. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*: CR. 2008;27(1):48
49. Miura K, Fujibuchi W, Ishida K, Naitoh T, Ogawa H, Ando T, Yazaki N, Watanabe K, Haneda S, Shibata C, Sasaki I. Inhibitor of apoptosis protein family as diagnostic markers and therapeutic targets of colorectal cancer. *Surg Today*. 2011;41(2):175-82.
50. Mojsa, Barbara, Iréna Lassot, and Solange Desagher. "MCL1 Ubiquitination: Unique Regulation of an Essential Survival Protein." *Cells* 3.2 (2014): 418–437. PMC.
51. Montero J., Antony Letai, Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic?, *Cell Death and Differentiation* volume 25, (2018) pages 56–64
52. Morkel, Markus et al. "Similar but Different: Distinct Roles for KRAS and BRAF Oncogenes in Colorectal Cancer Development and Therapy Resistance." *Oncotarget* 6.25 (2015): 20785–20800.
53. Mukhopadhyay S., Prashanta Kumar Panda, Niharika Sinha, Durgesh Nandini Das, Sujit Kumar Bhutia. Autophagy and apoptosis: where do they meet?. *Apoptosis*. 2014(4): 555–566.

54. Nair P., Min Lu, Sean Petersen, Avi Ashkenazi, Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway. *Methods Enzymol.* 2014; 544: 99–128
55. National Institutes of Health (US); Biological Sciences Curriculum Study. NIH Curriculum Supplement Series [Internet]. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US); 2007. Understanding Cancer. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>
56. Nakajima W, Hicks MA, Tanaka N, Krystal GW, Harada H. NOXA determines localization and stability of MCL1 and consequently ABT-737 sensitivity in small cell lung cancer. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1052.
57. Nalejska E, Mączyńska E, Lewandowska MA, Prognostic and predictive biomarkers: tools in personalized oncology. *Mol Diagn Ther.* 2014;18(3):273-84.
58. Nallamilli, B. R. R., & Hegde, M.. Genetic testing for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Current Protocols in Human Genetics*, 94, (2017) 10.12.1–10.12.23.
59. NCBI Pubmed Health Glossary, Cancer (Malignant Neoplasm), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0015630/>
60. NCBI Pubmed Health, Informed Health Online [Internet], 2016, How do cancer cells grow and spread? <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0072594/>
61. Oikonomou, E., Koustas, E., Goulielmaki, M., & Pintzas, A.. BRAF vs RAS oncogenes: are mutations of the same pathway equal? differential signalling and therapeutic implications. *Oncotarget*, 5(23) (2014), 11752–11777.
62. Oikonomou Eftychia, Vivian Kosmidou , Anastasia Katseli , Konstantinos Kothonidis , Despina Mourtzoukou , George Kontogeorgos , Ladislav Andera , Georgios Zografos and Alexander Pintzas, TRAIL receptor upregulation and the implication of KRAS/BRAF mutations in human colon cancer tumors, *Int. J. Cancer*: 125, (2009) '2009 UICC, 2127–2135
63. Prior, Ian A., and John F. Hancock. “Ras Trafficking, Localization and Compartmentalized Signalling.” *Seminars in cell & developmental biology* 23.2 (2012): 145–153. PMC
64. Qiu, Tianzhu et al. “Subsequent Anti-VEGF Therapy after First-Line Anti-EGFR Therapy Improved Overall Survival of Patients with Metastatic Colorectal Cancer.” *OncoTargets and therapy* 11 (2018): 465–471. PMC.
65. Roberts P. J., C. J. Der , Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer, *Oncogene*. 2007; 26(22): 3291–3310.
66. Sameer AS. Colorectal Cancer: Molecular Mutations and Polymorphisms. *Frontiers in Oncology*. 2013;3:114.
67. Sasaki, Takamitsu, Kuniyasu Hiroki, and Yuichi Yamashita. “The Role of Epidermal Growth Factor Receptor in Cancer Metastasis and Microenvironment.” *BioMed Research International* 2013 (2013): 546318. PMC.

68. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, et al. Colorectal cancer statistics. *Ca: A Cancer Journal for Clinicians*, 2017
69. Silke J, Meier P. Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins—Modulators of Cell Death and Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013;5(2):a008730.
70. Silke J., Domagoj Vucic. IAP Family of Cell Death and Signaling Regulators, *Methods in Enzymology*, Chapter Two, Volume 545, 2014, Pages 35-65
71. Slattery, Martha L., Abbie Lundgreen, and Roger K. Wolff. “MAP Kinase Genes and Colon and Rectal Cancer.” *Carcinogenesis* 33.12 (2012): 2398–2408.
72. Thermofisher, MAPK cell signaling pathway, <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/cell-analysis/signaling-pathways/mitogen-activated-protein-kinase-mapk.html>
73. Thompson and Thompson, *Genetics in Medicine*, Chapter 16, (2007)
74. Thomas LW, Lam C, Edwards SW. MCL1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett.* 2010;584(14):2981-9.
75. Tong J, Wang P, Tan S, et al. MCL1 degradation is required for targeted therapeutics to eradicate colon cancer cells. *Cancer research*. 2017;77(9):2512-2521.
76. Torres-Adorno M. , Jangsoon Lee, Takahiro Kogawa, Peter Ordentlich, Debu Tripathy, Bora Lim and Naoto T. Ueno. Histone Deacetylase Inhibitor Enhances the Efficacy of MEK Inhibitor through NOXA-Mediated MCL1 Degradation in Triple-Negative and Inflammatory Breast Cancer *Clin Cancer Res*, 2017 (23) (16) 4780-4792 Angie
77. Walczak, Henning. “Death Receptor–Ligand Systems in Cancer, Cell Death, and Inflammation.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5.5 (2013): a008698. PMC.
78. Weinberg R.A., *The biology of cancer*, chapter 9, 2007, p.336
79. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*. 2011;30(1):87.
80. Wortzel I, Seger R. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. Santos E, ed. *Genes & Cancer*. 2011;2(3):195-209.
81. Yamagishi H, Kuroda H, Imai Y, Hiraishi H. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chinese Journal of Cancer*. 2016;35:4.
82. Yin D, Morris CR, Bates JH, German RR. Effect of misclassified underlying cause of death on survival estimates of colon and rectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2011

83. Zarkavelis G, Boussios S, Papadaki A, Katsanos KH, Christodoulou DK, Pentheroudakis G. Current and future biomarkers in colorectal cancer. *Annals of Gastroenterology*. 2017;30(6):613-621.
84. Zeestraten ECM, Benard A, Reimers MS, et al. The Prognostic Value of the Apoptosis Pathway in Colorectal Cancer: A Review of the Literature on Biomarkers Identified by Immunohistochemistry. *Biomarkers in Cancer*. 2013;5:13-29.

6. Παράρτημα

Εικόνα	Τίτλος	Σελίδα
1	Ιστολογία του παχέος εντέρου	13
2	Σταδιοποίηση και ποσοστά επιβίωσης του καρκίνου του παχέος εντέρου	14
3	Η ακολουθία αδένωμα προς καρκίνωμα	15
4	Μονοπάτια MAPK στα θηλαστικά	16
5	Ενεργοποίηση του μονοπατιού RAS-RAF-MEK-ERK μέσω ογκογονιδίου	19
6	Πρωτεΐνες οικογένειας BCL-2 και οι λειτουργίες τους	22
7	a) Το ενδογενές μιτοχονδριακό μονοπάτι και b) το εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης	24
8	Η MCL1 και BAK βρίσκονται συνεχώς στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, η MCL1 δεσμεύει την BAK και τη διατηρεί σε αδρανή μορφή. Εναλλακτικά, η MCL1 προσδένεται σε ενεργοποιές BH3-only πρωτεΐνες, όπως τη BIM, και να τις αποτρέπει από το να ενεργοποιήσουν την BAK. Ευαισθητοποιές BH3-only πρωτεΐνες, όπως η NOXA, μπορούν να αναστείλουν τη δέσμευση του BAK, ανταγωνιζόμενες με την MCL1 για την BH3 περιοχή της BAK. Οι ενεργοποιημένες BAK σχηματίζουν πόρους στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη για την απελευθέρωση κυτοχρώματος c και την ενεργοποίηση κασπασών. Παρόμοιοι μηχανισμοί ισχύουν και για τις αλληλεπιδράσεις BAX/MCL1	28

Πίνακας	Τίτλος	Σελίδα
1	Χαρακτηριστικά των δειγμάτων	35
2	Χαρακτηριστικά των δειγμάτων	35
3	Χαρακτηριστικά των δειγμάτων	35
4	Χαρακτηριστικά των δειγμάτων	35
5	Ανάλυση έκφρασης των γονιδίων των NOXA και MCL1	47

Σχήμα	Τίτλος	Σελίδα
1	Γράφημα του Mann Whitney test (Α) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων (Β) μεταξύ καρκινικών δειγμάτων ανάλογα με το στάδιο του όγκου (I/II και III/IV) και (Γ) μεταξύ καρκινικών δειγμάτων ανάλογα με το αν υπήρξε διήθηση στους λεμφαδένες ή όχι.	38
2	Γράφημα του Mann Whitney test (Α) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων που φέρουν KRAS μετάλλαξη, (Β) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων που δεν φέρουν KRAS μετάλλαξη, (Γ) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων που φέρουν KRASG13D μετάλλαξη και (Δ) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων που φέρουν μετάλλαξη στο 12 ^ο κωδικόνιο στο γονίδιο της KRAS.	40
3	Γράφημα του Mann Whitney test (Α) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων στο στάδιο I, (Β) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων στο στάδιο II, (Γ) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων στο στάδιο III, (Δ) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων στο στάδιο IV.	41
4	Γράφημα του Mann Whitney test (Α) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων, (Β) μεταξύ καρκινικών δειγμάτων ανάλογα με το στάδιο του όγκου (I/II και III/IV) και (Γ) μεταξύ καρκινικών δειγμάτων ανάλογα με το αν υπήρξε διήθηση στους λεμφαδένες ή όχι.	42
5	Γράφημα του Mann Whitney test (Α) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων που φέρουν KRAS μετάλλαξη, (Β) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων που δεν φέρουν KRAS μετάλλαξη, (Γ) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων που φέρουν KRASG13D μετάλλαξη και (Δ) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων που φέρουν μετάλλαξη στο 12 ^ο κωδικόνιο στο γονίδιο της KRAS.	43
6	Γράφημα του Mann Whitney test (Α) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων στο στάδιο I, (Β) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων στο στάδιο II, (Γ) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων στο στάδιο III, (Δ) μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων στο στάδιο IV.	45
7	Γράφημα του Mann Whitney test μεταξύ του λόγου έκφρασης NOXA/MCL1 μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων.	46
8	Καμπύλη ROC για την αξιολόγηση της διαφοροδιαγνωστικής αξίας (Α) της NOXA, (Β) της MCL1 και (Γ) του συνδυασμού των γονιδίων της NOXA και της MCL1.	48
9	Καμπύλες ROC για τη διαφοροδιαγνωστική αξία (Α) του γονιδίου της DR5, (Β) του γονιδίου της DR5 σε συνδυασμό με το γονίδιο της MCL1, (Γ) του γονιδίου της DR5 σε συνδυασμό με το γονίδιο της NOXA και (Δ) του γονιδίου της DR5 σε συνδυασμό με τα γονίδια της MCL1 και της NOXA.	49
10	Καμπύλες ROC για την αξιολόγηση της συνδυαστικής διαφοροδιαγνωστικής αξίας των γονιδίων (Α) των NOXA και cIAP1, (Β) των NOXA και cIAP2, (Γ) των MCL1 και cIAP1 και (Δ) των MCL1 και cIAP2.	50
11	Καμπύλες ROC για την συνδυαστική διαφοροδιαγνωστική αξία των γονιδίων των (Α) NOXA, MCL1 και cIAP1, (Β) NOXA, MCL1 και cIAP2 και (Γ) NOXA, MCL1, cIAP1, cIAP2 και DR5.	51

